

UNTERSUCHUNGEN ZUR REPLIKATION DES
WOODCHUCK HEPATITIS VIRUS (WHV)
UND SEROLOGISCHE MARKER NACH
EXPERIMENTELLER INFEKTION VON AMERIKANISCHEN
WALDMURMELTIEREN (WOODCHUCKS) MIT DEM WHV

HORST LUTZ HARALD SPROTTE

~~1987~~

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Friedrich Deinhardt

Vorgelegt über das
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

Untersuchungen zur Replikation des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)
und serologische Marker nach experimenteller Infektion von
amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks) mit dem WHV

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

von

Horst Lutz Harald Sprotte

aus Dortmund

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Risse

Referent: _____ Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Koreferent: _____ Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: _____ 26. Februar 1988

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Schrifttum	3
2.1. Die Hepadnaviridae	3
2.2. Das Woodchuck Hepatitis Virus	4
2.3. Replikation der Hepadnaviren	7
2.4. Natürliche und experimentelle Infektion mit WHV	8
3. Ziel der Arbeit	13
4. Eigene Untersuchungen	15
4.1. Material und Methoden	15
4.1.1. Woodchucks	15
4.1.1.1. Herkunft	15
4.1.1.2. Unterbringung	15
4.1.1.3. Fütterung	16
4.1.1.4. Blutentnahme und Biopsie	16
4.1.2. Experimentelle Infektion	17
4.1.3. Entwicklung eines Tests für anti-WHc	18
4.1.3.1. Testbeschreibung	18
4.1.3.2. Isolierung von IgG aus Serum	20
4.1.3.3. Peroxidasekopplung von IgG	20
4.1.3.4. Isolierung von WHcAg	21
4.1.4. Entwicklung eines Tests für anti-WHs	23
4.1.4.1. Testbeschreibung	23
4.1.4.2. Isolierung von WHsAg	25
4.1.4.3. Immunisierung eines Kaninchens mit WHsAg	25
4.1.5. Entwicklung eines Tests für WHsAg	27
4.1.5.1. Testbeschreibung	27
4.1.5.2. RIA für HBV-Marker	29
4.1.5.3. Seren	29

4.1.6. Gelelektrophorese.....	30
4.1.7. Silberfärbung von Acrylamidgelen.....	31
4.1.8. Nachweis von WHV-DNA.....	32
4.1.8.1. WHV-DNA-Nachweis im Serum.....	32
4.1.8.2. WHV-DNA-Nachweis in der Leber.....	33
4.1.8.3. Präparation radioaktiv markierter WHV-DNA mittels Nick-Translation.....	34
4.1.8.4. Präparation radioaktiv markierter WHV-RNA mittels SP 6-Polymerasereaktion.....	35
5. Ergebnisse.....	37
5.1. Isolierung von WHcAg.....	37
5.2. Isolierung von WHsAg.....	39
5.3. Immunisierung eines Kaninchens mit WHsAg.....	42
5.4. Optimierung des ELISA für anti-WHc.....	43
5.4.1. Antigentitration.....	43
5.4.2. Titration von anti-WHc zur Beschichtung der Testplatten.....	44
5.4.3. Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHc.....	45
5.4.4. Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität.....	46
5.5. Optimierung des ELISA für WHsAg.....	48
5.5.1. Titration von anti-WHs zur Beschichtung der Testplatten.....	48
5.5.2. Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHs.....	49
5.5.3. Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität.....	50
5.6. Optimierung des Tests für anti-WHs.....	53
5.6.1. Antigentitration.....	53
5.6.2. Titration von anti-WHs zur Beschichtung der Testplatten.....	54
5.6.3. Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHs.....	55
5.6.4. Titration anti-WHs positiver und anti-WHs negativer Seren.....	56
5.7. Experimentelle Infektion.....	58
5.8. Nachweis von WHV-DNA.....	62
5.8.1. WHV-DNA-Nachweis im Serum.....	62
5.8.2. WHV-DNA-Nachweis in der Leber.....	62

6. Diskussion.....	65
6.1. Beurteilung der ELISA's für die WHV-Marker	65
6.2. Experimentelle Infektion	67
7. Zusammenfassung	71
7.1. Summary	72
8. Literaturverzeichnis	73

1. Einführung

Das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) gehört der Familie der Hepadnaviridae an. Der wichtigste Vertreter dieser Virusfamilie ist das Hepatitis B Virus (HBV) des Menschen.

Das WHV wurde bei amerikanischen Waldmurmeltieren (engl.: Woodchuck) entdeckt, die primäre hepatozelluläre Carcinome aufwiesen. Nach seiner Charakterisierung (41,59,61,62,72) wurde eine relativ enge Verwandtschaft zwischen dem HBV und dem WHV nachgewiesen (8,13,15,59,72).

Nach der Untersuchung von natürlich und experimentell infizierten Woodchucks wurde sehr schnell klar, daß die Epidemiologie, das Vorkommen chronischer Infektionen und deren Korrelation zum Auftreten von hepatozellulären Carcinomen bei der Woodchuck Hepatitis ähnlich sind wie bei der Hepatitis B (12,32,34,42,45,48,54,62,64,71,76).

Das natürliche Erreger-Wirt-System Woodchuck und WHV wird deshalb als Modell für die HBV-Infektion und die Genese HBV-induzierter primärer hepatozellulärer Carcinome beim Menschen verwendet.



2. Schrifttum

2.1. Die Hepadnaviridae

Unter der Bezeichnung Hepadnaviren (48) wurde eine Gruppe von DNA-Viren zusammengefaßt, deren Manifestationsorgan die Leber ist: Hepatitis-DNA-Viren.

Es handelt sich dabei um Viren mit einer Größe von 40 - 47 nm (48, 50,59,72). Charakteristisch für die Viren dieser Gruppe ist, daß ihr Genom als zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA vorliegt, das Nucleocapsid eine DNA-Polymerase enthält (48,61,62,65,66), und die Replikation über ein RNA-Intermediat mittels einer reversen Transkription erfolgt (65,66).

Bisher sind vier derartige Viren bekannt:

1. Hepatitis B Virus (HBV) beim Menschen
2. Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) beim amerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax*)
3. Groundsquirrel Hepatitis Virus (GSHV) beim Erdhörnchen (*Spermophilus beecheyi*)
4. Duck Hepatitis B Virus (DHBV) bei der Pekingente (*Anas domesticus*)

Die Verwandtschaft hinsichtlich der Übereinstimmung in der DNA-Sequenz beträgt zwischen dem HBV und dem WHV etwa 70% (13), zwischen HBV und GSHV bzw. DHBV etwa 55% (57) respektive 40% (26). Die Homologie in der DNA-Sequenz ist zwischen dem WHV und dem GSHV >80% (66).

Bei den Hepadnaviren der Säugetiere enthalten die Oberflächenproteine zu etwa 25% gemeinsame Aminosäuresequenzen, das DHBV zeigt zu den Säuger-Hepadnaviren keine Homologie in der Proteinsequenz (8,48). Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen WHV-Oberflächenproteine haben gezeigt, daß von fünf antigenen Epitopen der Virushülle bei den Hepadnaviren der Mammalia ein Epitop allen drei Viren gemein ist (3,4,5).

2.2. Das Woodchuck Hepatitis Virus

Das WHV ruft bei Woodchucks eine infektiöse Hepatitis hervor, deren chronische Verlaufsform mit dem Auftreten eines hepatozellulären Carcinoms assoziiert ist (42,44,45,50,54,61,71).

Entdeckt wurde das WHV, nachdem in einer Kolonie von Woodchucks des Zoos von Philadelphia (Pennsylvania) im Autopsiematerial von Woodchucks eine überproportionale Häufigkeit von hepatozellulären Carcinomen festgestellt wurde. Bei allen Tieren mit hepatozellulärem Carcinom wurden im nichttumorösen Lebergewebe degenerative und regenerative Veränderungen als Zeichen einer chronischen Hepatitis festgestellt. Aufgrund dieser Befunde und des Vorkommens intranucleärer Einschlusskörper postulierte Snyder (60) eine virale Ätiologie der Hepatitis. Die virale Genese konnte Summers (61,62,72) nachweisen, nachdem er im Serum von Woodchucks mit hepatozellulärem Carcinom Partikel fand, die eine DNA-Polymerase enthielten und bezüglich Größe, Dichte, Aufbau und DNA-Struktur Ähnlichkeit mit dem HBV aufwiesen.

Das WHV ist ein Virus mit einer Größe von 40 - 45 nm (59) und einer Dichte von 1,205 - 1,234 g/cm³ (61). Es setzt sich aus einer Hülle und dem darin enthaltenen Nucleokapsid zusammen. Die Hülle besteht aus Oberflächenantigenen (WHsAg -Woodchuck Hepatitis Virus surface Antigen). Dieses besteht aus sechs Proteinen unterschiedlicher Konfiguration (3,4,5), die jedoch in ihrem Hauptanteil von einem gemeinsamen Leseraster des Genoms abgeschrieben werden (siehe Abb. 1). Die Oberflächenproteine unterscheiden sich, abhängig von den Startsignalen für ihren Leserahmen, zum einen in ihrer Größe, zum anderen darin, ob sie unglycosyliert, glycosyliert oder zweifach glycosyliert vorliegen (5,45,56,66).

Das Capsid ist aus den Core-Proteinen zusammengesetzt. Es hat eine Größe von 27 - 30 nm (41,59), die Dichte liegt bei 1,353 - 1,340 g/cm³ (41,72). Das Nucleocapsid enthält die DNA, eine DNA-Polymerase, welche eine reverse Transkriptase-Aktivität besitzt (65,66), und wahrscheinlich ein DNA-gebundenes Protein (61,62,65).

Im Serum liegt das WHsAg nur zu einem geringen Teil in vollständigen Viruspartikeln vor. Den Hauptanteil des in Serum nachweisbaren viralen

Antigens stellen unvollständige Viruspartikel dar, die als tubuläre oder sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 20 - 24 nm vorliegen (59). Die Dichte dieser Partikel liegt bei 1,198 - 1,214 g/cm³ (61). Gelegentlich findet man im Serum auch große sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 55 - 120 nm, sogenannte Pseudovirions, die jedoch keine DNA enthalten (59).

Die DNA liegt in einer zirkulären, partiell doppelsträngigen Form vor, die Genomlänge beträgt 3308 Basenpaare (13). Dabei liegt keiner der beiden DNA-Stränge kovalent geschlossen vor, sondern die zirkuläre Form wird durch die Überlappung des plus-Stranges und des minus-Stranges über etwa 250 Basenpaare erhalten (65). Der minus-Strang hat eine konstante Länge, an sein 5'-Ende ist ein Protein kovalent gebunden (16). Der plus-Strang ist von variabler Länge, sein 5'-Ende befindet sich aber an einer fixen Position des Genoms (24,46,55).

Das Genom enthält vier offene Leserahmen, die mit s, c, p und x bezeichnet werden.

- Die Regionen pre s₁, pre s₂ und s enthalten die Leserahmen für die Oberflächenproteine.

Region s codiert für ein Protein von 22 kilodalton (kd) Länge (P_S²²), das auch als glycosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht (MG) von 25000 vorliegt (P_S²⁵). Das P_S²² stellt das Hauptprotein der Virushülle dar.

Der pre s₂ Leserahmen umfaßt die s-Region und weitere 180 Basenpaare. Das Genprodukt ist ein Protein das in glycosylierter Form mit einer Größe von 33 kd vorliegt (P_S³³). In zweifach glycosylierter Form hat es ein MG von 36000 (P_S³⁶).

Von der Sequenz die den gesamten offenen Leserahmen pre s₁, pre s₂ und s enthält ist, wird ein Protein von 45 kd (P_S⁴⁵) abgeschrieben, das glycosyliert eine Größe von 47 kd hat (P_S⁴⁷) (56).

- Die Region c enthält den Code für das Nucleocapsidprotein.
Die Größe des c-Proteins ist für das WHV bisher noch nicht genau bestimmt worden. Nach der Länge des Leserahmens muß es sich jedoch um ein Protein von 18 - 22 kd handeln.
- Vom Leserahmen p wird die Sequenz der DNA-Polymerase abgeschrieben.

- Die Region x codiert für ein Protein bisher unbekannter Funktion. Dieses Protein hat wahrscheinlich eine transaktivierende Funktion, möglicherweise indem es an einer Aktivierung von Promotoren beteiligt ist (51).

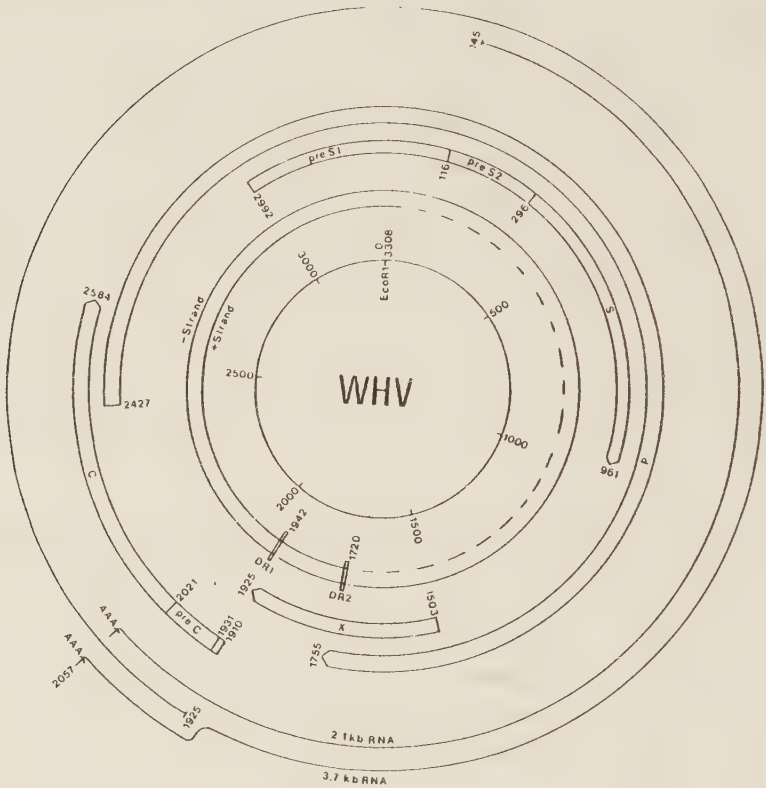


Abb. 1: Genom des Woodchuck Hepatitis Virus (nach Galibert et al. 1982 (13))

2.3. Replikation der Hepadnaviren

Der Replikationsmechanismus der Hepadnaviren konnte zunächst von Summers und Mason (64,65) für das DHBV geklärt werden. Sie konnten zeigen, daß für die Replikation der Virus-DNA RNA-Intermediate benutzt werden, die über eine reverse Transkription zur Synthese der DNA führen. Später konnte dieser Replikationszyklus für das HBV nachvollzogen werden (2,7,11,30,31).

Nach dem Eindringen des Virus in die Zelle wird die Hülle des Virus entfernt, die DNA aus dem Corepartikel freigesetzt und in den Zellkern eingeschleust. Dort wird die DNA zu einer komplett doppelsträngigen zirkulären DNA (cccDNA) vervollständigt, die eine 'supercoiled Configuration' annimmt. Von dieser DNA werden durch zelluläre RNA-Polymerasen zwei RNA-Haupttranskripte des minus-Stranges abgeschrieben. Diese RNA-Stränge haben eine Länge von 2,1 und 3,5 Kilobasen (kb). Das 3,5 kb Transkript, das sogenannte Pre-Genom (65), enthält das gesamte Genom sowie weitere etwa 100 Nucleotide (siehe Abb. 1). Dies spricht dafür, daß es ein Produkt einer kovalent geschlossenen DNA ist (66). Die pregenomische RNA wird zusammen mit der DNA-Polymerase und dem DNA-gebundenen Protein in das Capsid verpackt. Durch reverse Transkription wird nun ein vollständiger DNA-minus-Strang synthetisiert. Bereits während der reversen Transkription wird das Pre-Genom durch eine RNase vom 3'-Ende her abgebaut. Übrig bleibt ein etwa 20 Basen langes Stück des 5'-Endes, welches als 'Primer' für die Synthese des plus-Stranges dient. Bereits bevor die Synthese des plus-Stranges abgeschlossen ist, wird das Nucleocapsid mit Oberflächenproteinen umhüllt, und die Ausschleusung des Virus wird induziert (64,65,66).

Eine Integration von Virus-DNA in das Wirtszellgenom ist für die Replikation nicht notwendig (66).

2.4. Natürliche und experimentelle Infektion mit WHV

Der Ablauf einer WHV-Infektion ist durch das Auftreten verschiedener Serummarker gekennzeichnet:

- Woodchuck Hepatitis Virus Oberflächenantigen (WHsAg)

WHsAg ist der wichtigste Marker einer ablaufenden akuten oder chronischen Infektion. Gelegentlich laufen akute Infektionen ab, ohne daß WHsAg im Serum nachweisbar ist (45,71,76). Das WHsAg hat möglicherweise mehrere Subtypen (71).

- Antikörper gegen WHsAg (anti-WHs)

Das Auftreten von anti-WHs geht mit einer Beendigung des virämischen Stadiums einher (34,40,71,76). Dabei wird anti-WHs häufig erst einige Wochen oder Monate nach Beendigung der Virämie nachweisbar.

In einzelnen Fällen sind die anti-WHs-Titer so niedrig, daß diese Antikörper nicht (34,44,71), oder nur mit hochempfindlichen Methoden nachgewiesen werden können (40).

- Antikörper gegen das Coreantigen (anti-WHc)

Anti-WHc tritt im Verlauf einer akuten WHV-Infektion bereits während oder nach der virämischen Phase auf, und kann über mehrere Jahre persistieren. Im Verlauf chronischer Infektionen werden immer hohe Titer anti-WHc nachgewiesen. Diese Antikörper werden als Indikator dafür angesehen, daß eine Virusreplikation stattgefunden hat, bzw. für eine noch stattfindende Virusvermehrung, wenn gleichzeitig WHsAg nachweisbar ist, wie dies bei chronisch infizierten Tieren der Fall ist.

Anti-WHc ist kein neutralisierender Antikörper, und hat keinen Einfluß auf die Beendigung der Virämie (71). Andererseits zeigen Immunisierungsversuche mit HBcAg bei Schimpansen, daß anti-HBc einen gewissen Schutz vor einer HBV-Infektion bedingen kann, wenn hohe anti-HBc und anti-HBe-Titer gebildet wurden, bzw. bei niedrigen Titern eine Infektion milde verlief (21).

Bei einer akuten Infektion liegt der anti-WHc-Titer (10^{-1} - 10^{-4}) deutlich niedriger als bei einer chronischen Infektion (10^{-4} - 10^{-6}) (40).

- Woodchuck Hepatitis Virus e-Antigen (WHeAg)

Das WHeAg ist bisher nicht charakterisiert worden. Das e-Antigen ist ein Spaltprodukt des Nucleokapsidantigens, das als lösliches Antigen im Serum während der virämischen Phase nachgewiesen werden kann, entsprechend dem HBeAg beim HBV (17,32,34). WHeAg ist bisher nur indirekt mittels Testverfahren zum Nachweis von HBeAg nachgewiesen worden. Es ist mit diesen Testverfahren nicht regelmäßig nachweisbar.

- Antikörper gegen WHeAg (anti-WHe)

Antikörper gegen das WHeAg sind, wie das Antigen selbst, mit den bisher verwendeten Methoden (32,34) nicht immer nachweisbar.

- Woodchuck Hepatitis Virus DNA (WHV-DNA) und DNA-Polymerase

WHV-DNA sowie DNA-Polymerase können im Serum in Viruspartikeln während der virämischen Phase nachgewiesen werden (24,35,40,44,62).

Die serologischen Marker WHsAg, anti-WHs, anti-WHc, WHeAg und anti-WHe zeigen Kreuzreaktionen mit den entsprechenden Markern der HBV-Infektion. Die Angaben über die Stärke der Kreuzreaktion sind unterschiedlich, abhängig von der jeweils angewendeten Methode (17,25,32,34,40,41,45, 59,72,76,)

Bei natürlichen Infektionen kann, wie für das HBV, die Übertragung durch Blut, Serum und andere Körperflüssigkeiten angenommen werden (48). Ob die Infektion vertikal weitergegeben wird, ist bisher nicht geklärt.

Die Inkubationszeit wird für die natürliche Infektion mit etwa vier Monaten angegeben unter der Annahme, daß die Infektion im frühen Neugeborenenstadium erfolgt (71), mit etwa zwei Monaten bei Kontaktinfektion von älteren Tieren (40,71). Natürliche Infektionen verlaufen als akute oder chronische Infektionen (45,71,76), wobei es regionale Unterschiede in der Prävalenz für WHV-Infektionen gibt (33,34,45,48,50,70).

Bei experimenteller Infektion beträgt die Inkubationszeit zwischen zwei und dreizehn Wochen, im Mittel etwa sechs Wochen (25,34,40,71,76). Die Dauer der virämischen Phase liegt dabei zwischen einer Woche (25) und vierundvierzig Wochen (34). Bei den meisten akuten Infektionen hält die Antigenämie vier bis sechs Wochen an. In einzelnen Fällen wurden akute Infektionen beobachtet, bei denen im Serum kein Virusantigen nachweisbar

war. Nur durch das Auftreten von anti-WHc und/oder anti-WHs war nachweisbar, daß eine Infektion abgelaufen war (40,71).

Die Empfänglichkeit für eine WHV-Infektion ist bei neugeborenen und älteren Woodchucks gleich groß, ältere Tiere entwickeln aber eine weniger ausgeprägte Virämie (45). Je näher der Infektionszeitpunkt bei neugeborenen Woodchucks am Geburtstermin liegt, um so höher ist die Rate der chronischen Infektionen (45,50).

Sowohl akut als auch chronisch mit WHV infizierte Woodchucks zeigen keine klinischen Symptome einer Hepatitis. Auch ein Anstieg von leberspezifischen Enzymen im Serum ist nicht zu beobachten. Nur bei Woodchucks die ein hepatocelluläres Carcinom entwickeln, wird ein Anstieg der sGOT, der sGPT, und der gGT beobachtet.

Die chronische WHV-Infektion ist gekennzeichnet durch eine anhaltende Virämie und das Vorhandensein hoher anti WHc-Titer. Welche Mechanismen zur Entstehung chronischer Infektionen führen ist bislang ungeklärt.

Als gesichert kann das Auftreten von hepatocellulären Carcinomen im Zusammenhang mit chronischen WHV-Infektionen angesehen werden. Etwa 80% der natürlich infizierten Woodchucks, die länger als ein Jahr WHsAg-Träger sind, entwickeln früher oder später ein hepatocelluläres Carcinom (44,45,71), bei experimentell infizierten Woodchucks beträgt die Rate 100%. Dabei können bei unter experimentellen Bedingungen gehaltenen Tieren exogene chemische Carcinogene weitgehend ausgeschlossen werden (44). Welche Mechanismen zur Tumorentstehung führen, ist bisher weitgehend ungeklärt. Inwieweit die Integration viraler DNA in das Wirtszellgenom, die bei fast allen Tumoren feststellbar ist (35,39,52,51), für die Tumorentstehung verantwortlich ist, ist derzeit gleichfalls noch unklar.

Die Leber wurde lange Zeit als das einzige Organ angesehen, in dem eine Virusvermehrung stattfindet. Neuere Arbeiten (22,23,77) zeigen aber, daß auch in peripheren Blutlymphozyten, in Knochenmarkszellen und in lymphoiden Zellen der Milz eine Virusvermehrung, allerdings mit geringerer Replikation, stattfindet. In diesen Zellen konnten replikative Formen viraler DNA sowie RNA-Intermediate nachgewiesen werden.

Eine WHV-Infektion anderer Tierspezies mit einer nachweisbaren Virusvermehrung in diesen Spezies ist bisher nicht gelungen. Ein Infektionsversuch an einem Schimpansen führte nicht zu einer Virämie, lediglich anti-WHs und anti-WHc wurden gebildet. Das Auftreten von anti-WHc läßt jedoch darauf schließen, daß möglicherweise eine Virusvermehrung stattgefunden hat

(40,76). Die erfolgreiche Übertragung von Groundsquirrel Hepatitis Virus (GSHV) in einen nahe verwandten Wirt (*Eutamias* sp.) (68) deutet darauf hin, daß dies vielleicht auch für das WHV möglich sein müßte, obwohl bisher Übertragungsversuche auf Alpenmurmeltiere (*Marmota marmota*) erfolglos waren (67).

3. Ziel der Arbeit

Durch die nahe Verwandtschaft von WHV und HBV bietet sich mit dem Woodchuck ein Tiermodell zur Untersuchung der HBV-induzierten hepatozellulären Carzinome.

In dieser Arbeit sollte der Verlauf akuter WHV-Infektionen nach experimenteller Infektion untersucht werden. Neben dem Auftreten von WHV-Antigenen und den entsprechenden Antikörpern im Serum sollte das Auftreten von replikativen Formen von WHV-DNA in der Leber in Beziehung zu den serologischen Markern und dem Antigennachweis in der Leber studiert werden.

Für diese Untersuchungen wurden spezifische und sensitive Tests als ELISA für WHsAg, anti-WHs und anti-WHc entwickelt.

Die experimentelle Infektion bietet die Möglichkeit, das Anfangsstadium der Infektion genau zu untersuchen. Dies ist bei der Hepatitis B praktisch nicht möglich, da die Patienten normalerweise erst zur Untersuchung kommen wenn die Erkrankung manifest ist.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Material und Methoden

4.1.1. Woodchucks

4.1.1.1. Herkunft

Zwei Woodchucks, Nr. 472 und Nr. 476 wurden uns von Irving Millman, Institute for Cancer Research, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA, überlassen.

Die anderen Tiere wurden von James D. Whipple, Northern Wildlife, 631 Caswell Road, Freeville, N.Y. 13068, USA bezogen.

4.1.1.2. Unterbringung

Die Tiere wurden einzeln oder zu zweien gehalten. Als Käfige wurden Edelstahlkäfige mit einer Größe von 95 x 60 x 80 cm verwendet, die als Doppelkäfige konstruiert waren. Die beiden Käfighälften waren durch ein Schlupfloch verbunden, welches mit einem Schieber verschlossen werden konnte. Eine Hälfte des Doppelkäfigs diente als Schlafplatz mit einem Heunest, die andere Hälfte als Freßplatz. Diese Abteilung des Käfigs hatte eine bewegliche Rückwand, so daß die Tiere zur Fixation am vorderen Käfiggitter eingeklemmt werden konnten.

4.1.1.3. Fütterung

Gefüttert wurden die Woodchucks mit handelsüblichem pelletiertem Kaninchenfutter und Haferflocken. Zusätzlich wurden je nach Jahreszeit Salat, Äpfel, gelbe Rüben und frischer Kolbenmais zugefüttert. Wasser wurde ad libitum angeboten.

4.1.1.4. Blutentnahme und Biopsie

Zur Blutentnahme und zur Leberbiopsie wurden die Tiere narkotisiert. Für die Narkose wurde Xylazin (Rompun^R, Bayer) und Ketamin (Ketavet^R, Parke-Davis) verwendet, in einer Dosierung von 2,5 - 3 mg/kg KGW Xylazin und 30 - 35 mg/kg KGW Ketamin. Die Applikation erfolgte intramuskulär. Mit dieser Dosierung wurde eine Anästhesie für 10 - 15 min erzielt.

Die Blutentnahme erfolgte aus der V. saphena. Zur Leberbiopsie wurden die Tiere in Rückenlage gelagert. Nach chirurgischer Vorbereitung wurde auf der rechten Seite paramedian in dem Winkel zwischen Rippenbogen und Processus xiphoideus ein Hautschnitt von 0,5 cm Länge angelegt und die Bauchwand mit einem spitzen Skalpell perforiert. Durch diese Öffnung wurde eine Biopsiekanüle von 1 mm Durchmesser eingeführt, die Leber aufgesucht und die Biopsie entnommen.

Die gewonnenen Biopsieproben wurden für die DNA-Extraktion sofort nach der Entnahme auf Trockeneis gefroren und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

4.1.2. Experimentelle Infektion

Vier Woodchucks wurden experimentell mit WHV infiziert. Als Inokulum wurde Serum eines chronisch WHV-infizierten Woodchucks verwendet. Dieses Serum enthielt WHV-DNA. Das Serum war bis zum Infektionszeitpunkt bei -20°C aufbewahrt, und wurde erst unmittelbar vor der Infektion aufgetaut.

Die Inokulation erfolgte intravenös mit 0,5 ml Serum bei Woodchuck Nr. 8 (W 8) und Nr. 9 (W 9) bzw. mit 0,7 ml Serum bei Nr. 472 (W 472) und Nr. 476 (W 476). Als Kontrolle diente ein nicht infiziertes Tier (W 7).

Von allen Tieren wurde einmal wöchentlich Blut entnommen, bei W 7 und W 8 wurde von der 5. bis zur 12. Woche zweimal wöchentlich Blut entnommen.

Bei W 7, W 8 und W 9 wurde am Tag 0 eine Leberbiopsie entnommen, von W 7 und W 8 wurde von der 5. bis zur 12. Woche einmal wöchentlich eine Leberbiopsie entnommen.

Woodchuck Nr. 9 starb am 25. Tag p. i. während eines therapeutisch-operativen Eingriffs.

4.1.3. Entwicklung eines Tests für anti-WHc

4.1.3.1. Testbeschreibung

Für den Nachweis von anti-WHc wurde ein ELISA entwickelt. Der Test wurde als Sandwich-Inhibitionstest aufgebaut.



1. Anti-WHc IgG binden an die Platte



2. Absättigen freier Bindungs-
kapazitäten



3. WHcAg wird gebunden



4. Vorhandenes Serum-anti-WHc
bindet



5. Peroxidasegekoppeltes anti-WHc
besetzt freie Bindungsstellen



6. Substrat wird umgesetzt

Abb. 2: ELISA für anti-WHc: Testaufbau

An die feste Phase, eine Polystyrol-Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) wurden anti-WHc IgG in einer Verdünnung von 1:1000 gebunden. Als Puffer diente dafür ein 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5, in jeden Napf wurden 50 µl einpipettiert. Die Beschichtung wurde bei 4°C für 18^h in einer feuchten Kammer durchgeführt. Alle weiteren Beschichtungs- und Inkubationsvorgänge wurden ebenfalls in einer feuchten Kammer durchgeführt. Anschließend wurde vier mal mit Waschpuffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (400 g NaCl, 10 g KCl, 144,9 g NaH₂PO₄·12 H₂O, 10 g KH₂P₂O₄, ad 5000 ml H₂O)) mit 0,05% Tween 20 (Serva, Heidelberg; 37470)) gewaschen. Freie Bindungsstellen an der festen Phase wurden mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) (Serva, 11924) in PBS abgesättigt, je Napf 100 µl, für 2^h bei 20°C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden je 50 µl WHcAg 1:100 in PBS zugegeben, und 18^h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch Waschen entfernt. Von den Serumproben wurden jeweils 50 µl einpipettiert, nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde wieder gewaschen. Nun wurden peroxidasegekoppelte anti-WHc IgG, je 50 µl, in einer Verdünnung von 1:200 in PBS, zugegeben und wieder 2^h bei 37°C inkubiert. Gekoppelte Antikörper, die nicht mit dem Antigen reagieren konnten, wurden durch einen letzten Waschvorgang entfernt. Schließlich wurde das Substrat für die Peroxidase (Orthophenylendiamin (OPD)) (Merck, Darmstadt; 7243) 1 mg/ml und H₂O₂ 30%ig (Merck, 7209) 1 µl/ml in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 zugesetzt, die Inkubation erfolgte in einer dunklen Kammer. Nach 5 min wurde die Reaktion mit 0,5 M H₂SO₄ gestoppt.

Die Stärke der enzymatischen Reaktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 486 nm mit einem ELISA-Photometer SLT 210 (SLT Labinstruments, Salzburg, Österreich) bestimmt. Die 0-Wert Einstellung erfolgte mit einem 'blank'-Ansatz (PBS statt Antigen, PBS statt Serum).

Auf jeder Testplatte wurden zwei Positivkontrollen und sechs Negativkontrollen mitgeführt.

Die Berechnung der Inhibitionswerte erfolgte nach der Formel:

$$100 - \frac{(A_s - OA_h) \cdot 100}{(OA_n - OA_h)}$$

- A_s: Absorption des Serums
- OA_h: Mittelwert Absorption des 'blank'-Ansatzes
- OA_n: Mittelwert Absorption der Negativkontrollen

Als positiv wurden Seren beurteilt, deren Inhibition mehr als 50% betrug.

4.1.3.2. Isolierung von IgG aus Serum

Zur Isolierung der IgG-Fraktion aus anti-Wlic- bzw. anti-WlIs-enthaltendem Serum wurde das Serum 1:2 mit Aqua dest. verdünnt und unter ständigem Rühren gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7,4) bis zu einem Sättigungsgrad von 45% zugegeben. Zur vollständigen Fällung wurde die Suspension 20 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurde 20 min mit 5000 Upm bei 4°C in einem Rotor A 8.24 (Kontron) zentrifugiert, das Pellet in 45%iger Ammoniumsulfatlösung resuspendiert und noch einmal unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde aufgenommen in 2 ml Tris-Puffer pH 8,0 (20 mM Tris-HCl pH 8, 0,28 mM NaCl, 0,02% NaN₃) und das Ammoniumsulfat durch Chromatographie über eine Sephadex G 25 PD 10 -Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden; 17-0851-01) abgetrennt, wobei der gleiche Tris-Puffer als Elutionspuffer diente. Die IgG-Lösung wurde anschließend durch Affinitätschromatographie über Affi-Gel blue (Bio-Rad Richmond, Californien, USA; 153-7303) weiter gereinigt. Die Laufbedingungen dabei waren: Säulenvolumen 10 ml, Elutionspuffer Tris-Puffer pH 8,0, Laufgeschwindigkeit 45 ml/h, Fraktionsgröße 3 ml. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD₂₈₀) bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden zusammengefaßt.

4.1.3.3. Peroxidasekopplung von IgG

Für die Kopplung von IgG mit Meerettichperoxidase (HRPO) wurden 6,7 mg HRPO (Sigma, P-8375) in 1,675 ml Aqua dest. gelöst (4 mg/ml), zu dieser Lösung wurden 0,33 ml einer frisch angesetzten 0,1 M Na-Perjodatlösung (Merck, 6597) gegeben und 20 min bei 20°C gerührt. Das Perjodat wurde anschließend durch Chromatographie über eine PD 10 - Säule entfernt, wobei die Peroxidase gleichzeitig in einen 1 mM Na-Acetatpuffer überführt wurde.

Durch Zugabe von 50 µl 0,2 M Carbonatpuffer pH 9,5 wurde nun der pH-Wert auf 9,0 - 9,5 angehoben und sofort 13,4 mg IgG in 1,675 ml 0,01 M Carbonatpuffer pH 9,5 (8 mg IgG/ml, 2 mg IgG/mg HRPo) zugegeben und 2^h bei 20°C gerührt. Die Reaktion wurde gestoppt durch den Zusatz von 200 µl einer frisch angesetzten Na-Borhydridlösung (Merck, 6371) mit einer Konzentration von 4 mg/ml. Das Konjugat wurde dann 2^h bei 4°C stehen gelassen.

Die Abtrennung nicht gekoppelter Antikörper erfolgte durch Gelfiltrationschromatographie über eine Säule mit Sephacryl S-200 Superfine (Pharmacia, 17-0871-01) von 1,6 mm Durchmesser und 95 cm Länge. Die Laufgeschwindigkeit betrug 30 ml/h, als Elutionspuffer wurde PBS verwendet, die Fraktionsgröße betrug 2,5 ml. Von den gesammelten Fraktionen wurde die OD₂₈₀ (Absorptionsmaximum von Proteinen) und die OD₄₀₃ (Absorptionsmaximum der Peroxidase) bestimmt und das Verhältnis OD₄₀₃/OD₂₈₀ errechnet. Am besten geeignet sind die Fraktionen bei denen das Verhältnis zwischen 0,3 und 0,6 liegt. Die entsprechenden Fraktionen wurden zusammengefaßt. Nach Zusatz von 10 mg BSA/ml Konjugat wurde aliquotiert, die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

4.1.3.4. Isolierung von WHcAg

Das Capsidantigen wurde aus Zellen einer perfundierten Leber eines chronisch infizierten Woodchucks isoliert. 24 ml Zellsuspension wurden mit der gleichen Menge Extraktionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgSO₄, 50 mM NaCl, 0,1% 2-Merkaptoethanol, 0,1 mg/ml BSA, 0,25 M Saccharose) gemischt und auf Eis in einem Homogenisator zerkleinert. Das Homogenat wurde 15 min mit 15000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und noch einmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten zentrifugiert. Der Gradient wurde geschichtet mit 1,2 ml 30% Saccharose, 0,7 ml 15% Saccharose (Saccharoselösungen in Extraktionspuffer) und 2,1 ml Homogenat. Zentrifugiert wurde 3^h mit 50000 Upm bei 4°C in einem Rotor TST 60.4 (Kontron). Der Überstand wurde jeweils verworfen, die Pellets wurden

aufgenommen in je 0,1 ml Cäsiumchloridlösung mit einer Dichte von $1,20 \text{ g/cm}^3$. Die weitere Reinigung erfolgte über einen CsCl-Gradienten. Dieser wurde geschichtet mit jeweils 0,9 ml CsCl-Lösungen mit einer Dichte von 1,40, 1,35, 1,30 und $1,25 \text{ g/cm}^3$, darüber wurden 0,4 ml des aufgenommenen Pellets geschichtet. Zentrifugiert wurde 55^h mit 40000 Upm bei 4°C in einem Rotor TST 60.4. Der Gradient wurde ausgetropft zu Fraktionen von etwa 250 μl . Von jeder Fraktion wurde refraktometrisch die Dichte bestimmt und der Gehalt an WHcAg in einer Verdünnung von 1:6 im Enzym Immuno Assay bestimmt. Die Fraktionen mit WHcAg-Gehalt im Bereich der für die Core-Partikel typischen Dichte wurden zusammengefaßt, gegen PBS dialysiert und bei -70°C aufbewahrt.

4.1.4. Entwicklung eines Tests für anti-WHs

4.1.4.1. Testbeschreibung

Für den Nachweis von anti-WHs wurde ein ELISA entwickelt, der als Sandwich-Inhibitionstest aufgebaut wurde.



1. Anti-WHs IgG binden an die Platte



2. Absättigen freier Bindungs-
kapazitäten



3. WHsAg wird gebunden



4. Im Serum vorhandenes anti-WHs
bindet



5. Peroxidasegekoppeltes anti-WHs
besetzt freie Bindungsstellen



6. Substrat wird umgesetzt

Abb. 3: ELISA für anti-WHs: Testaufbau

Zunächst wurden anti-WlIs IgG, die durch Immunisierung eines Kaninchens mit WlIsAg erhalten wurden, an eine Mikrotiterplatte gebunden. Die Beschichtung erfolgte in einem 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 für 18^h bei 4°C in einer feuchten Kammer, die anti-WlIs IgG wurden in einer Verdünnung von 1:800 verwendet. Anschließend wurde vier mal mit Waschpuffer gewaschen. Freie Bindungsstellen an der Platte sowie unspezifische Reaktionen der Kaninchen-IgG gegen Woodchuck-Serumproteine wurden mit 1% Gelatine (Sigma, Deisenhofen; G 0510) und 2% negativem Woodchuckserum in PBS für 4^h bei 37°C abgesättigt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde WlIsAg zugegeben und 4^h bei 37°C inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch Waschen entfernt. Nun wurde von den Serumproben jeweils 50 µl einpipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde wieder gewaschen. Anschließend wurden peroxidasegekoppelte anti-WlIs in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben und 2^h bei 37°C inkubiert. Die peroxidasemarkierten Kaninchen-IgG wurden zuvor 4^h bei 37°C mit 2% BSA und 2% negativem Woodchuckserum vorinkubiert. HRPO-konjugierte Antikörper, die nicht mit dem Antigen reagieren konnten, wurden durch Waschen entfernt. Anschließend wurde das Substrat für die Peroxidase (OPD/H₂O₂) zugegeben, für 20 min bei 20°C inkubiert und die enzymatische Reaktion mit 0,5 M H₂SO₄ gestoppt.

Die Stärke der Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 486 nm photometrisch bestimmt. Die 0-Wert Einstellung erfolgte mit einem 'blank'-Ansatz (PBS statt Antigen, PBS statt Serum).

Auf jeder Testplatte wurden zwei Positivkontrollen und sechs Negativkontrollen mitgeführt.

Die Berechnung der Inhibitionswerte erfolgte nach der Formel:

$$100 - \frac{(A_s - \bar{O}A_n) \cdot 100}{\bar{O}A_n - \bar{O}A_k}$$

- A_s: Absorption des Serums
- $\bar{O}A_n$: Mittelwert Absorption des 'blank'-Ansatzes
- $\bar{O}A_k$: Mittelwert Absorption der Negativkontrollen

Als positiv wurden Seren beurteilt, deren Inhibition mehr als 50% betrug.

4.1.4.2. Isolierung von WHsAg

Das WHsAg wurde aus Serum eines chronisch infizierten Woodchucks isoliert. Zwei mal 2,5 ml Serum wurden über jeweils 8 ml 20%ige Saccharoselösung für 22^h mit 36000 Upm bei 4°C in einem Rotor TST 41.14 (Kontron) zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 1 ml TNE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA) aufgenommen und weiter durch Gelfiltrationschromatographie über Bio Gel A-5m (100 - 200 mesh) (Bio Rad 151-0740) gereinigt. Die Säulendimension war 1,5 x 90 cm, die Laufgeschwindigkeit betrug 21 ml/h, die Fraktionsgröße betrug 3,15 ml. Als Elutionspuffer wurde TNE verwendet. Die gewonnenen Fraktionen wurden in einer Verdünnung von 1:11 auf ihren WHsAg-Gehalt unter Ausnutzung der Kreuzreaktion mit dem HBsAg in einem kommerziell erhältlichen RIA (AUSRIA^R, Abbott, Chicago, USA) getestet. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde anhand der OD₂₈₀ bestimmt. Die WHsAg positiven Fraktionen wurden zusammengefaßt, eingengt durch Ultrafiltration (Amicon, Witten/Ruhr; Filter XM 50) und über einen CsCl-Gradienten zentrifugiert. Der Gradient wurde geschichtet mit je 3 ml CsCl-Lösungen mit einer Dichte von 1,40, 1,35, 1,30 und 1,25 g/cm³. Zentrifugiert wurde 70^h mit 26000 Upm in einem Rotor SW 28 (Beckmann, Palo Alto, Californien, USA). Der Gradient wurde ausgetropft zu Fraktionen von etwa 600 µl, von denen refraktometrisch die Dichte gemessen wurde sowie der Antigengehalt in einer Verdünnung von 1:11 im AUSRIA^R bestimmt wurde. Die Fraktionen mit dem größten Antigengehalt wurden in einem Pool zusammengefaßt, dialysiert gegen PBS, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

4.1.4.3. Immunisierung eines Kaninchens mit WHsAg

Die Reinigung von WHsAg, das zur Immunisierung verwendet wurde, erfolgte in gleicher Weise wie in 4.1.4.2. beschrieben. Nach dem Austropfen des Gradienten wurden die Fraktionen einzeln dialysiert gegen PBS. Von den Fraktionen die WHsAg enthielten wurden jeweils 10 µl entnommen und die Reinheit des Antigens durch Gelelektrophorese mit anschließender Silber-

färbung überprüft. Die Fraktionen die kein sichtbares Fremdprotein enthielten wurden für die Immunisierung verwendet.

Ein Kaninchen wurde mit diesem gereinigtem WHsAg immunisiert. Zur Inokulation wurde das Antigen zu gleichen Teilen mit komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt und intrakutan appliziert. Am 14. Tag wurde eine weitere Inokulation durchgeführt, sie erfolgte subkutan unter Verwendung von inkomplettem Freund'schem Adjuvans. Weitere Inokulationen ohne Adjuvans erfolgten am 21. und 28. Tag intravenös. Am 69. Tag erfolgte eine weitere Booster-Inokulation subkutan. Am 77. Tag wurde das Kaninchen entblutet.

Dem Kaninchen wurde am Tag 0, 13, 20, 27, 34, 42 und 69 Blut entnommen. Diese Seren, sowie das Serum vom Tag 77 wurden in einem Test für anti-HBs (AUSAB^R) auf anti-WHs untersucht.

Aus dem Serum vom Tag 77 wurden die IgG isoliert, ein Teil davon wurde mit Peroxidase gekoppelt (siehe 4.1.3.2. und 4.1.3.3.).

4.1.5. Entwicklung eines Tests für WHsAg

4.1.5.1. Testbeschreibung

Für den Nachweis von WHsAg wurde ein ELISA entwickelt.



1. Anti-WHs IgG binden an die Platte



2. Absättigen freier Bindungskapazitäten



3. WHs Antigen im Serum wird gebunden



4. Peroxidasegekoppeltes anti-WHs bindet



5. Substrat wird umgesetzt

Abb. 4: ELISA für WHsAg: Testaufbau

An Polystyrol-Mikrotiterplatten wurden anti WHs IgG, die durch Immunisierung eines Kaninchens mit WHsAg erhalten wurden, gebunden. Die Beschichtung erfolgte mit 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 für 18^h bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die anti-WHs IgG wurden in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Nicht gebundene Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 entfernt. Freie Bindungsstellen an der Platte sowie unspezifische Reaktionen der Kaninchen-IgG gegen Woodchuck-Serumproteine wurden mit 1% Gelatine und 2% negativem Woodchuckserum in PBS für 4^h bei 37°C abgesättigt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden von den Serumproben jeweils 50 µl einpipettiert. Sofern WHsAg im Serum enthalten war, wurde es von den an der Platte haftenden Antikörpern gebunden. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde wieder gewaschen. Das gebundene Antigen wurde nachgewiesen durch Reaktion mit peroxidasegekoppelten anti-WHs für 2^h bei 37°C. Die peroxidasemarkierten Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:100 wurden zuvor 4^h bei 37°C mit 2% BSA und 2% negativem Woodchuckserum in PBS vorinkubiert. HRPO-konjugierte Antikörper, die nicht mit Antigen reagieren konnten, wurden durch Waschen entfernt. Anschließend wurde das Substrat für die Peroxidase (OPD/H₂O₂) zugegeben, für 15 min bei 20°C inkubiert und die enzymatische Reaktion mit 0,5 M H₂SO₄ gestoppt.

Die Stärke der Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 486 nm photometrisch bestimmt. Die 0-Wert Einstellung erfolgte mit einem 'blank'-Ansatz (PBS statt Serum).

Auf jeder Testplatte wurden zwei Positivkontrollen und sechs Negativkontrollen mitgeführt.

Als positiv wurden Seren beurteilt, deren Extinktionswert das 2,1-fache des Mittelwertes der Negativkontrollen überschritt.

4.1.5.2. RIA für HBV-Marker

Zur Prüfung der Spezifität und der Sensitivität der ELISA für die WHV-Marker anti-WHc, anti-WHs und WHsAg wurden kommerziell erhältliche Tests für die entsprechenden HBV-Marker (anti-HBc: CORAB^R, anti-HBs: AUSAB^R, HBsAg: AUSRIA^R) der Firma Abbott (Abbott, Chicago, USA) verwendet.

Bei der Isolierung des WHsAg wurde das WHsAg im Verlauf der Reinigungsprozedur unter Ausnutzung der Kreuzreaktion mit dem HBsAg mit dem AUSRIA^R nachgewiesen.

4.1.5.3. Seren

Die zur Prüfung der entwickelten Tests verwendeten Woodchuckseren stammten zu einem Teil von Tieren im Besitz des Max von Pettenkofer-Instituts, zum anderen Teil waren es Seren, die uns von Jesse Summers, Institute for Cancer Research, Fox Chase Center, Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt wurden.

Die verwendeten Humansenen waren Seren, die von der Abteilung Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts zur Verfügung gestellt wurden.

Die Negativseren zur Prüfung der entwickelten Tests waren Präseren.

Die positiven Seren zur Prüfung des ELISA für anti-WHc waren Seren von chronisch WHV-infizierten Woodchucks, bzw. chronischen HBV-Trägern.

Zur Prüfung des ELISA für WHsAg wurden ebenfalls Seren von chronisch WHV-infizierten Woodchucks verwendet, die Humansenen waren Seren, die in der Hepatitisdiagnostik als HBsAg positiv gefunden wurden.

Die Woodchuckseren die zur Prüfung des ELISA für anti-WHs verwendet wurden stammten von Tieren von denen bekannt war, daß sie eine akute WHV-Infektion gehabt hatten. Die verwendeten Humansenen waren Seren die in der Hepatitisdiagnostik als anti-HBs positiv gefunden wurden.

4.1.6. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 15%ige Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgele verwendet. Die Gele wurden zwischen zwei entfettete Glasplatten von 17,5x14,5 cm gegossen, die durch Abstandhalter mit einer Dicke von 0,5 mm voneinander getrennt waren. Die Glasplatten wurden mit Klammern zusammengehalten in eine schmale Schale gestellt, diese zu ungefähr 0,5 cm mit 1% Agar gefüllt und die Kanten der Platten ebenfalls mit 1% Agar abgedichtet.

Zunächst wurde nun das eigentliche Trenngel gegossen, dafür wurden folgende Lösungen zusammengegeben: 7,5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5; 10,44 ml Solution A (28 g Acrylamid, 0,735 g Dithiothreitol (DADT), H₂O ad 100 ml); 1,47 ml H₂O; 0,5 ml Ammoniumperoxidsulfat 14 mg/ml (AMPER) frisch angesetzt; 0,1 ml SDS 20%; 6,25 µl Tetramethyläthylendiamin (TEMED). Das Trenngel wurde bis 3/4 der Plattenhöhe gegossen und mit 1 ml Aqua dest. überschichtet, dieses wurde nach Polymerisierung des Gels abgegossen. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen, dafür wurden zusammengegeben: 8,2 ml H₂O; 1,5 ml Solution B (96 ml 1 M Tris-HCl pH 7,0, 4 ml SDS 20%); 1,7 ml Solution A; 0,6 ml AMPER; 6 µl TEMED. Vor dem Gießen wurde ein Kamm eingesetzt der die für den Probenauftrag vorgesehenen Räume im Sammelgel freihält. Nach Festwerden des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Glasplatten mit dem dazwischenbefindlichen Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Elektrolytreservoirs mit Elektrodenpuffer (15 g Trisbase, 72 g Glycin, 4 g SDS, H₂O ad 5000 ml) gefüllt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen zu gleichen Teilen mit Elektrophoresepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,0, 3% SDS, 20% Saccharose, 5% 2-Mercaptoäthanol, in Bromphenolblau) gemischt und 5 min im Wasserbad gekocht.

Als Größenmarker dienten Lysozym MG 14400, Sojabohnen Trypsininhibitor MG 21500, Carboanhydrase MG 31000, Ovalbumin MG 45000, Bovines Serumalbumin MG 66200 und Phosphorylase B MG 92500 (Bio Rad 161-0304).

Die Elektrophorese wurde durchgeführt mit 35 mA für 5^h.

4.1.7. Silberfärbung von Acrylamidgelen

Die Acrylamidgele wurden von den Glasplatten abgenommen und in eine Plexiglaswanne gegeben. Zunächst wurden die Proteine in dem Gel in drei Schritten fixiert.

1. 30 min mit 125 ml Methanol, 25 ml Eisessig, ad 250 ml H₂O
2. über Nacht mit 12,5 ml Methanol, 17,5 ml Eisessig, ad 250 ml H₂O
3. 30 min mit 250 ml 10%iger Glutardialdehydlösung

Das Gel wurde nun 3^h gewaschen mit H₂O (5 x wechseln) und anschließend 15 min gefärbt mit einer Silbernitratlösung (31,5 ml 0,1 M NaOH, 2,1 ml NH₃ 25%ig, 1,2 g AgNO₃ in 6 ml H₂O, ad 150 ml H₂O). Vor dem Entwickeln wurde 3 x 5 min gewaschen mit H₂O. Als Entwickler wurde eine Lösung mit 10 mg Zitronensäure und 125 µl Formalin 38%ig verwendet, der Entwicklungsvorgang dauerte 5 - 10 min. Abschließend wurde das Gel 15 min fixiert mit 2,5 mg Natriumthiosulfat in 300 ml Aqua dest., 5 x 30 min in Aqua dest. gewaschen, und in nassem Zustand fotografiert.

4.1.8. Nachweis von WHV-DNA

4.1.8.1. WHV-DNA-Nachweis im Serum

Zum Nachweis von WHV-DNA im Serum wurde ein Spot-Test durchgeführt. Von den Serumproben wurden jeweils 5 µl auf ein Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll, Dassel, Membranfilter 0,45 µm) aufgetropft. Als Kontrollen wurden bekannte WHV-DNA-positive und -negative Seren mitgeführt. Zur Bestimmung der DNA-Menge im Serum wurde eine Verdünnungsreihe clonierter WHV-DNA (Clon pw 8) verwendet. Der Clon pw 8 wurde uns freundlicherweise von Jesse Summers, Institute for Cancer Research, Fox Chase Center, Philadelphia, USA, überlassen.

Nach dem Antrocknen der Proben wurde 15 min bei 20°C mit 3 ml 1 M NaCl/0,1 M NaOH inkubiert und wieder getrocknet. Es folgte ein weiterer Inkubationsvorgang von 15 min bei 20°C mit 3 ml 1 M NaCl/0,1 M Tris-HCl pH 7,5. Das Filter wurde wieder getrocknet und gewaschen in 200 ml 2x SSC (17,35 g NaCl, 8,02 g Na-Citrat, ad 1000 ml H₂O, pH 7,0). Das Filter wurde wieder getrocknet und anschließend für 2^h bei 80°C unter Vakuum gebacken. Nun wurde das Filter in eine Kunststoffolie eingeschweißt, 10 ml Prähybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 0,1% BSA, 0,2% Ficoll, 0,2% Polyvinylpyrrolidin (PVP), 1% Glycin, 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,5, 250 mg/ml Kalbsthymus-DNA (CT-DNA)) zugegeben und mindestens 4^h bei 42°C inkubiert. Die Vorhybridisierungslösung wurde dann entfernt und 10 ml Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 0,1% BSA, 0,04% Ficoll, 0,04% PVP, 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,5, 100 mg/ml CT-DNA) sowie durch Nick-Translation radioaktiv markierte WHV-DNA (pro cm² Filterfläche 250000 cpm) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Abschließend wurde 3 x 5 min gewaschen mit 2x SSC/0,1% SDS bei 20°C, und 3 x 20 min gewaschen bei 52°C mit 0,1% SSC/0,1% SDS. Nach dem Trocknen des Filters wurde es in eine Haushaltsfolie eingeschlagen, und bei -70°C auf einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat S) exponiert. Nach 1 - 3 Tagen wurde der Film entwickelt.

4.1.8.2. WIIV-DNA-Nachweis in der Leber

Das Lebergewebe (20 - 50 mg) wurde in 2 ml NGM-Puffer (4 M Guanidin-rhodanid (Fluka 50990), 0,05 M 2-Mercaptoäthanol, 50 mM Na-Acetat pH 5,5) homogenisiert, und anschließend über einen diskontinuierlichen CsCl-Gradienten aus je 1 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,80 und 1,50 g/cm³ zentrifugiert. Es wurde 16^h mit 38000 Upm bei 4°C in einem Rotor TST 60.4 zentrifugiert.

Zur Gewinnung der DNA aus dem Gradienten wurde dieser von oben abgetragen. Der NGM-Überstand wurde verworfen, die CsCl-Fraktion, die die DNA enthält, wurde gesammelt. Zur Entfernung des CsCl wurde 4^h bei 20°C gegen TE 10/1-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA) dialysiert. Um eventuell noch vorhandene Proteine, die bei der weiteren Analyse stören könnten zu zerstören, wurde anschließend für 2^h bei 37°C mit 0,06 mg/ml Proteinase K verdaut.

Zur DNA-Extraktion wurde dieser Ansatz mit der gleichen Menge Phenol ausgeschüttelt, die wässrige Phase abgenommen und noch einmal ausgeschüttelt mit der gleichen Menge Chloroform/Isoamylalkohol 24:1. Die wässrige Phase wurde wieder abgenommen, 1/10 Volumen 2,5 M Na-Acetat pH 5,2 zugegeben und mit dem 2,5-fachen Volumen eiskaltem Äthanol absolut über Nacht bei -20°C gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert mit 12000 Upm bei -5°C für 30 min in einem Rotor A 8.24, das Pellet aufgenommen in 70% Äthanol und noch einmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet lyophilisiert.

Die lyophilisierte DNA wurde in 20 µl H₂O aufgenommen. Von diesen Proben wurden jeweils die Hälfte mit Eco R I verdaut, und unverdaut und verdaut mit dem Southern-Blot Verfahren analysiert.

Durch Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente nach Länge und Konfiguration getrennt. Für die Elektrophorese wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Die Proben wurden gemischt mit je 1 µl Elektrophoresepuffer (50% Saccharose, 5 mg/ml Xylencyanol, 5 mg/ml, in Bromphenolblau), auf das Gel aufgetragen und mit 24 V über Nacht getrennt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde als Größenmarker mit Hind III verdaute Lambda-DNA

mitgeführt. Als Elektrodenpuffer wurde ein Puffer mit 40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7,8 verwendet.

Das Gel wurde anschließend 10 min mit 0,125 M HCl gewaschen, die DNA mit 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH denaturiert für 30 min und schließlich durch 2 x 30 min Waschen mit 3 M NaCl/0,5 M Tris-HCl pH 7,0 neutralisiert. Die DNA wurde dann durch einen Saugblot über Nacht auf Nitrozellulose übertragen; als Puffer diente dabei 20x SSC.

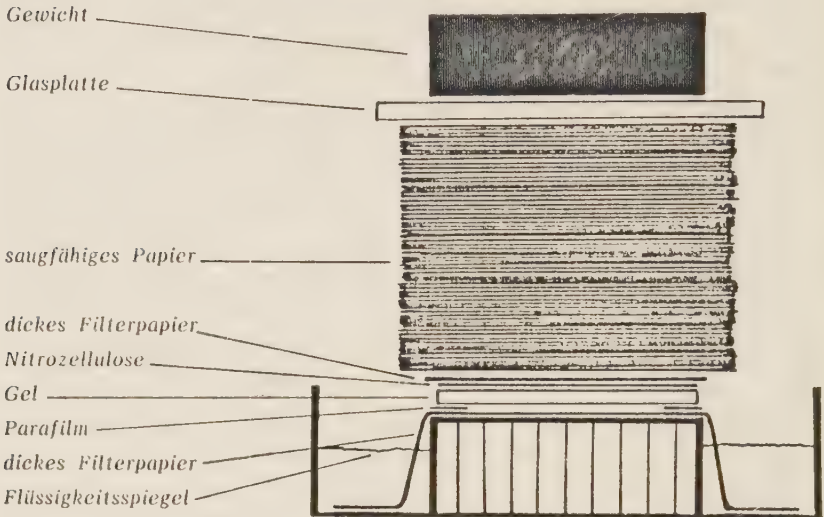


Abb. 5: Southern-Blot

4.1.8.3. Präparation radioaktiv markierter WHV-DNA mittels Nick-Translation

Zur Herstellung radioaktiv markierter WHV-DNA wurde eine clonierte WHV-DNA verwendet (Clon pw 8). Für den Reaktionsansatz wurde ein Nick-Translationskit (Amersham N 5000) benutzt. Die Reaktion wurde angesetzt mit 10,5 μ l H_2O , 1 μ l (36 ng) WHV-DNA, 5 μ l Nucleotide A,C,G, 2,5 μ l

Enzym (DNA-Polymerase) und 6 μ l 32 dTTP, der Ansatz wurde 2^h bei 14°C inkubiert.

Die freien Nucleotide wurden anschließend chromatographisch abgetrennt. Verwendet wurde dafür Bio-Gel A-1,5m, das Säulenvolumen betrug etwa 1,5 ml, als Elutionspuffer wurde TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) verwendet, die Fraktionsgröße betrug 100 μ l. Von jeder Fraktion wurden 2 μ l entnommen und die Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität im DNA-Peak wurden für die Hybridisierung verwendet. Bevor diese DNA zu der Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde sie 5 min im Wasserbad gekocht, um sie einzelsträngig zu machen.

4.1.8.4. Präparation radioaktiv markierter WHV-RNA mittels SP 6-Polymerasereaktion

Für die Herstellung radioaktiv markierter WHV-RNA wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 4 μ l 5x Reaktionspuffer (Amersham SP 6-System (Amersham RPN 1506)
- 1 μ l 0,2 M Dithiothreitol (Sigma D-0632)
- 1 μ l RNase-Inhibitor (Boehringer, Mannheim; 799 017)
- 1,5 μ l Nucleotidmix (Amersham SP 6-System)
- 2 μ l (1 μ g) WHV-DNA, Fragment mit den Basenpaaren 1529 bis 1914
- 4 μ l 32 P-UTP (Amersham), 10 μ Ci/ μ l
- 1 μ l SP 6 DNA-Polymerase (Boehringer, 810 266)

ad 20 μ l H₂O

Der Ansatz wurde 1,5^h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die freien Nucleotide chromatographisch abgetrennt wie in 4.1.8.3. beschrieben.

5. Ergebnisse

5.1. Isolierung von WHcAg

Leberzellen wurden homogenisiert und die Corepartikel durch Zentrifugation über einen Saccarosegradienten pelletiert. Das Pellet wurde aufgenommen und über einen CsCl-Gradienten zentrifugiert. Nach Austropfen des Gradienten wurden von jeder Fraktion 10 µl in einer 1:6 Verdünnung als Doppelan-satz im ELISA auf den Gehalt an WHcAg getestet. Für die graphische Dar-stellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelan-satzes gebildet.

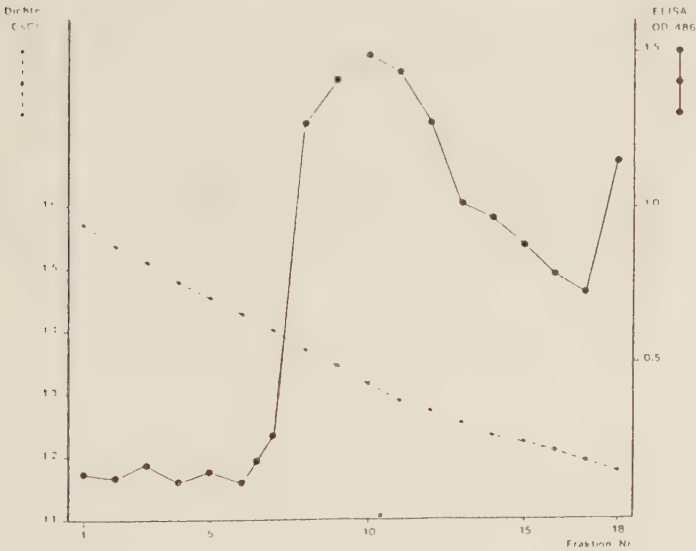


Abb. 6: Isolierung von WHcAg: Im CsCl-Gradienten findet man das Anti-gen bei einer Dichte zwischen 1,36 und 1,28 g/cm³

Im CsCl-Gradienten zeigt sich ein Peak bei einer Dichte zwischen 1,36 und 1,28 g/cm³ (Abb. 6).

Bei einer Kontrollpräparation aus einer Leber von der bekannt war, daß sie kein WHeAg enthielt, findet man bei der entsprechenden Dichte keine WHeAg-Aktivität (Abb. 7).

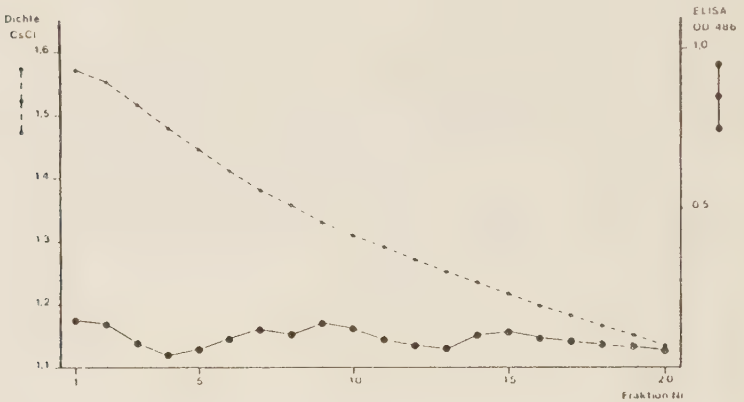


Abb. 7: Isolierung von WHeAg; Bei einer Kontrollpräparation aus einer bekannt negativen Leber zeigt sich bei der entsprechenden Dichte keine Aktivität.

5.2. Isolierung von WHsAg

Serum eines chronisch WHV-infizierten Woodchucks wurde über einen Saccharosegradienten pelletiert, das Pellet aufgenommen und durch Gelfiltrationschromatographie weiter gereinigt. Die Fraktionen die Antigen enthielten wurden zusammengefaßt, durch Ultrafiltration eingeeengt und über einen CsCl-Gradienten zentrifugiert.

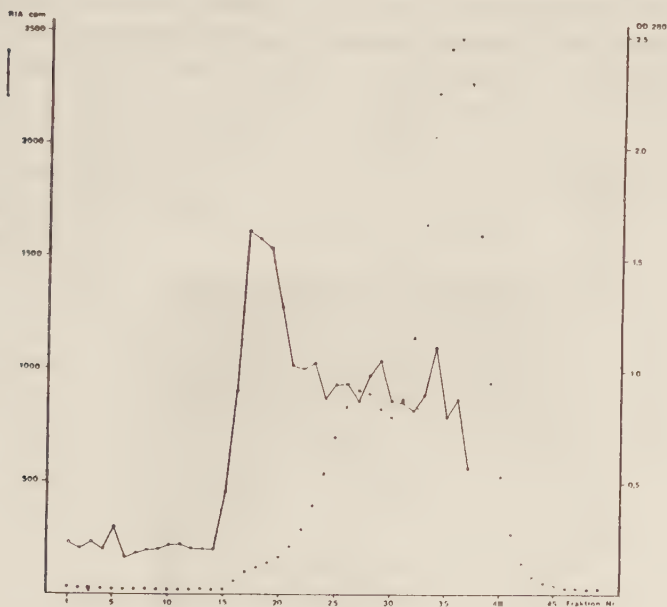


Abb. 8: Isolierung von WHsAg: Antigen- und Proteingehalt der Fraktionen nach dem chromatographischen Trennschritt.

Bereits nach zwei Reinigungsschritten, nach Zentrifugation und Gelfiltrationschromatographie, wurde eine weitgehende Abtrennung des partikulären Antigens von den Serumproteinen erreicht. Die Abb. 8 zeigt den Antigengehalt, gemessen in einer 1:11 Verdünnung im kommerziellen RIA (AUSRIA^R) unter Ausnutzung der Kreuzreaktion mit dem HBsAg, sowie den Proteingehalt, gemessen als OD₂₈₀, der Fraktionen nach dem chromatographischen Trennschritt.

Nach der Dichtezentrifugation im CsCl-Gradienten wurde das WHsAg bei einer Dichte von 1,25 bis 1,17 g/cm³ gefunden. In den Fraktionen 12 und 13 (Dichte von 1,220 - 1,234 g/cm³) war WHV-DNA enthalten, dies entspricht der Dichte der vollständigen Viruspartikel. Die Abb. 9 zeigt den Dichteverlauf in dem Gradienten und den Antigengehalt, gemessen im AUSRIA^R.

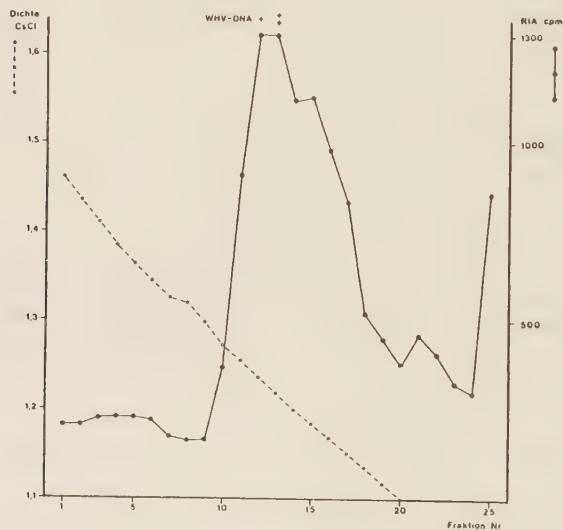


Abb. 9: Isolierung von WHsAg: Dichteverlauf, Antigengehalt und WHV-DNA im CsCl-Gradienten.

Die Proteine in den Fraktionen (10 - 18), die den Antigenpeak enthielten, wurden gelelektrophoretisch getrennt und mittels einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Abb. 10 zeigt die Fraktionen 11 - 16.

In den Fraktionen 14 und 15 war das WHsAg, wie die Silberfärbung der gelelektrophoretischen Proteintrennung zeigt, praktisch frei von Fremdproteinen. Die Größe der in diesen Fraktionen gefundenen Proteine wurde mit einem Molekulargewicht von 20000, 22500, 27000, 40000, 42500 und 46000 kalkuliert.

In der Fraktion 11 war, außer Banden von Serumproteinen, keine Bande sichtbar, deren Position der Größe eines WHV-spezifischen Proteins entsprach. Die Fraktion 12 enthielt eine Bande bei 22,5 kd, andere Banden, die in ihrer Größe WHV-Proteinen entsprechen würden, waren nicht sichtbar oder überlagert. In der Fraktion 13 waren die gleichen Banden sichtbar wie in den Fraktionen 14 und 15, darüber hinaus noch Banden bei 32000, 57000 und 66000. Bei der Bande bei 32000 könnte es sich auch um ein WHV-Protein handeln. Die Banden bei 20 kd in den Fraktionen 13 bis 15 könnten dem Core-Protein entsprechen. In der Fraktion 16 waren nur geringe Mengen Protein enthalten.

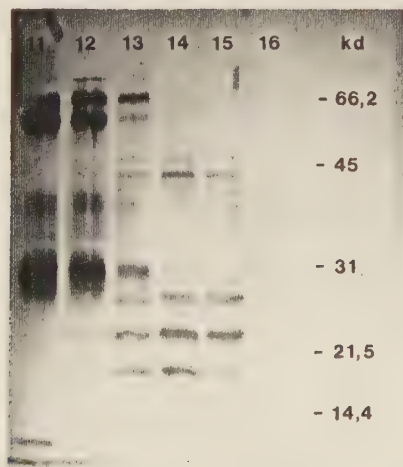


Abb. 10: Isolierung von WHsAg: Gelelektrophorese und anschließende Silberfärbung der Fraktionen 11 bis 16 des CsCl-Gradienten.

5.3. Immunisierung eines Kaninchens mit WHsAg

Ein Kaninchen wurde mit Material aus den Fraktionen 14 und 15 des CsCl-Gradienten immunisiert.

In den Blutproben die an den Tagen 13, 20, 27, 34, 42 und 69 entnommen wurden, konnte mit dem Test für anti-HBs (AUSAB^R) kein anti-WHs gefunden werden. Lediglich das Serum vom 77. Tag reagierte schwach positiv ($S/N = 3,75$, positiv ist $S/N \geq 2,1$).

Mit dem ELISA für anti-WHc konnten in diesen Kaninchenseren, nach vorheriger Präabsorption mit 10% negativem Woodchuckserum, keine Antikörper gegen das Capsidantigen nachgewiesen werden.

5.4. Optimierung des ELISA für anti-WHc

5.4.1. Antigentitration

Antigenverdünnungen in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 1:12,5 bis 1:3200 wurden als Doppelansatz auf eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit einer konstanten Menge anti-WHc IgG (Verdünnung 1:64) beschichtet war. Die relative Menge gebundenen Antigens wurde mit einer konstanten Verdünnung (1:100) von peroxidasegekoppeltem anti-WHc bestimmt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,2.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:100 gewählt.

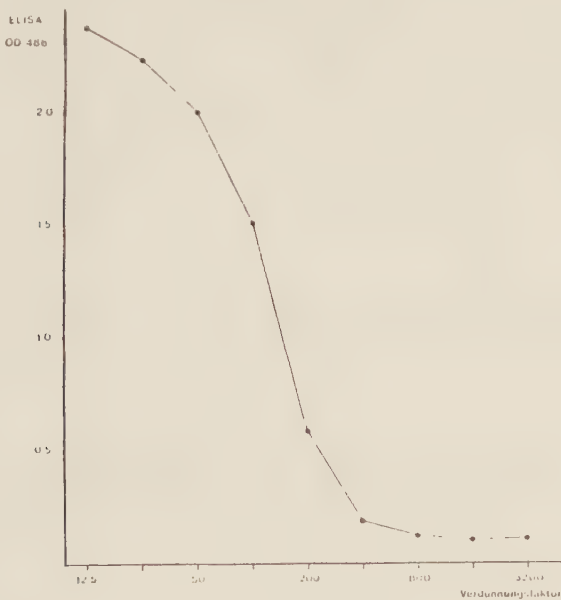


Abb. 11: Optimierung des Tests für anti-WHc: Antigentitration

5.4.2. Titration von anti-WHc zur Beschichtung der Testplatten

Eine Testplatte wurde mit einer log 2-Verdünnungsreihe anti-WHc IgG als Doppelansatz beschichtet, mit der zuvor ausgetesteten Verdünnung WHcAg (1:100) inkubiert, und die relative Menge gebundenen Antigens mit einer konstanten Verdünnung (1:100) peroxidasegekoppelter anti-WHc IgG ermittelt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,2.

Für den Test wurde eine Antikörperverdünnung von 1:1000 gewählt.

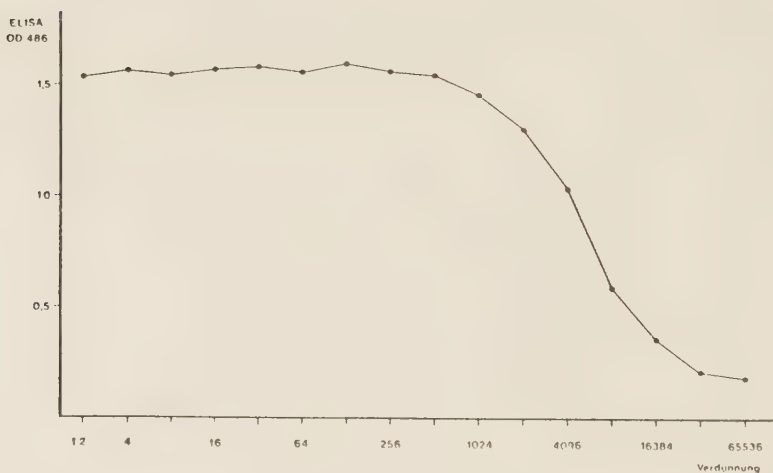


Abb. 12: Optimierung des Tests für anti-WHc; Titration der anti-WHc IgG zur Beschichtung der Testplatten.

5.4.3. Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHc

Auf eine mit den zuvor ausgetesteten Verdünnungen von anti-WHc (1:1000) und WHcAg (1:100) vorbeschichtete Testplatte wurde als Doppelansatz eine 1:2-Verdünnungsreihe peroxidasegekoppelter anti-WHc IgG gegeben. Die enzymatische Substratumssetzung wurde nach 5 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,025.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:200 gewählt.

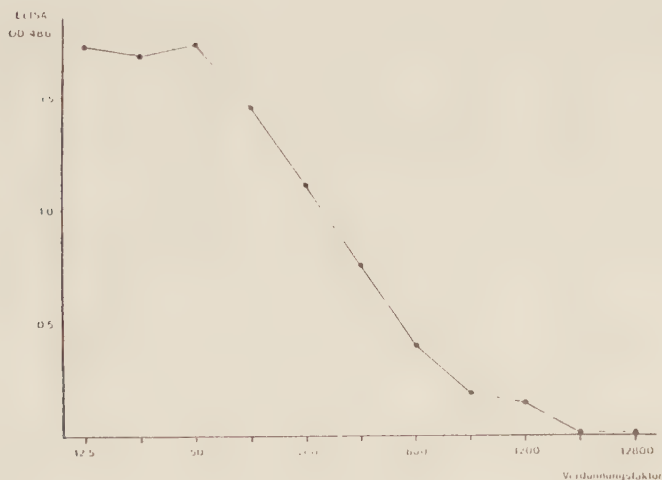


Abb. 13: Optimierung des Tests für anti-WHc: Titration peroxidasemarkierter anti-WHc IgG

5.4.4. Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität

Zur Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität des ELISA wurden drei als für anti-WHc positiv (im Test für anti-HBc (CORAB^R) reaktiv) und drei als für anti-WHc negativ (Präseren) bekannte Woodchuckseren in einer log-10 Verdünnungsreihe titriert.

Als positiv wurden Serumverdünnungen bewertet, deren Inhibitionswert $\geq 50\%$ war.

Die drei positiven Seren waren dabei deutlich reaktiv bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} bzw. 10^{-5} . Die negativen Seren zeigten in allen Verdünnungsstufen keine Reaktion.

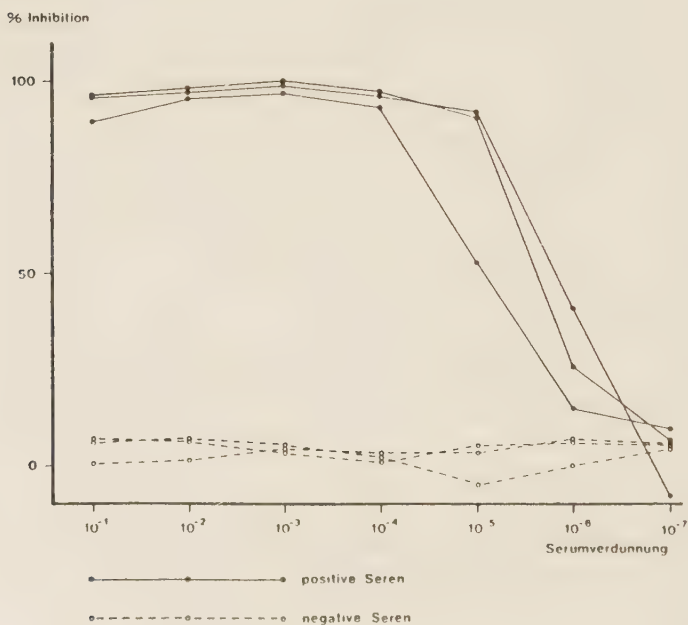


Abb. 14: Titration anti-WHc positiver und negativer Seren

Der ELISA wurde verglichen mit einem kommerziell erhältlichen Test für anti-HBc (CORAB^R, Abbott). Es wurden fünf anti-WHc positive Woodchuckseren und fünf anti-HBc positive Humanseren in einer log 10 Verdünnungsreihe getestet. Als positiv wurden in beiden Testsystemen Seren beurteilt, deren Inhibition mindestens 50% betrug.

Die Woodchuckseren reagierten im heterologen Test mindestens um den Faktor 1000 schlechter als im homologen Test. Die Humanseren reagierten im heterologen Testsystem mindestens um den Faktor 100 schlechter.

		anti-WHc ELISA	anti-HBc CORAB ^R
Woodchuckserum	1	10^{-3}	negativ
	2	10^{-4}	10^{-1}
	3	10^{-4}	negativ
	4	10^{-4}	10^0
	5	10^{-5}	10^{-1}
Humanserum	1	10^{-1}	10^{-4}
	2	10^{-1}	10^{-3}
	3	10^0	10^{-3}
	4	10^0	10^{-3}
	5	10^0	10^{-6}

Tab. 1: Vergleich des ELISA für anti-WHc mit einem Test für anti-HBc (CORAB^R).

5.5. Optimierung des ELISA für WHsAg

5.5.1.. Titration von anti-WHs zur Beschichtung der Testplatten

Eine Mikrotiterplatte wurde mit anti-WHs IgG in einer 1:2 Verdünnungsreihe von 1:50 bis 1:25600 in Doppelansätzen beschichtet. Diese wurde mit einer konstanten Verdünnung WHsAg (1:100) inkubiert, und nach einem Waschvorgang eine konstante Verdünnung (1:200) von peroxidasemarkiertem anti-WHs zugegeben. Auf diese Weise konnte die relative Menge gebundenen WHsAg ermittelt werden.

Die enzymatische Substratumssetzung wurde nach 10 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,1.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:400 gewählt.

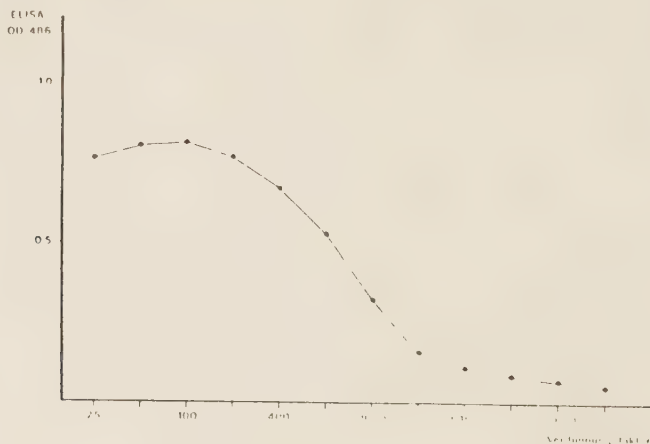


Abb. 15: Optimierung des Tests für WHsAg: Titration der anti-WHs IgG zur Beschichtung der Testplatten.

5.5.2. Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHs

Eine Mikrotiterplatte wurde mit anti-WHs IgG in einer Verdünnung von 1:400 beschichtet, und mit einer konstanten Verdünnung (1:100) WHsAg inkubiert. Zur Ermittlung einer ausreichenden Verdünnung der gekoppelten Antikörper wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe von 1:6,25 bis 1:12800 in Doppelansätzen angelegt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 10 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,02.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:100 gewählt.

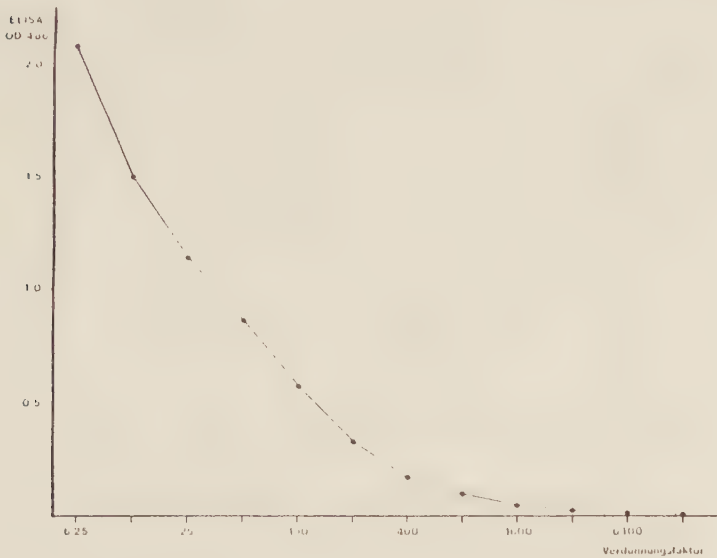


Abb. 16: Optimierung des Tests für WHsAg: Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHs

5.5.3. Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität

Es wurden drei als positiv (im Test für HBsAg (AUSRIA^R) reaktiv) und drei als negativ (Proseron) für WHsAg bekannte Seren in einer log 10 Verdünnungsreihe titriert.

Die positiven Seren zeigten bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} deutlich nachweisbares Antigen, die negativen Seren zeigten in allen Verdünnungsstufen keine Reaktion.

Als positiv bezeichnet werden Seren, deren Absorptionswert das Doppelte des Mittelwerts der Absorption der negativen Seren in der Verdünnung 10^{-6} überstieg.

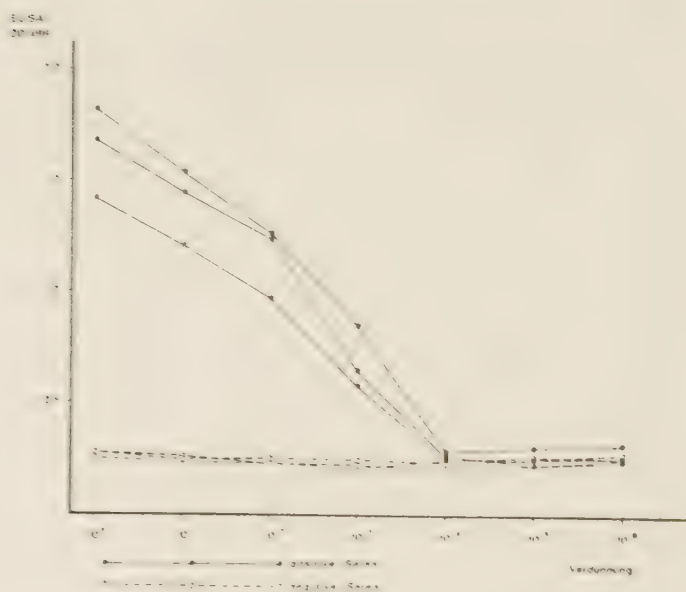


Abb. 17: Titration WHsAg positiver und negativer Seren

Außerdem wurde der ELISA mit einem kommerziell erhältlichen Test für HBsAg (AUSRIA^R) verglichen. Dazu wurden fünf WHsAg positive und fünf HBsAg positive Seren in log 10 Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-5} sowohl im homologen, wie im heterologen Test geprüft.

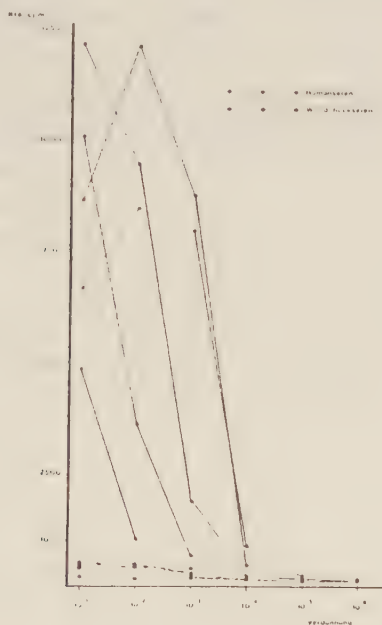


Abb. 18: Titration WHsAg positiver Woodchuckseren und HBsAg positiver Humansen im AUSRIA^R.

Dabei waren vier Woodchuckseren im AUSRIA^R lediglich schwach positiv, in einem Woodchuckserum konnte im heterologen Test kein Oberflächenantigen nachgewiesen werden. Von den Humansen waren vier im AUSRIA^R noch in einer Verdünnung von 10^{-3} als positiv erkennbar, eines in einer Verdünnung von 10^{-2} . Dieses Serum war in dieser Verdünnung noch deutlich positiver als die Woodchuckseren in der 10^{-1} Verdünnung. Der cut off-Wert lag bei 320 cpm.

Zwei der Humansenen reagierten in diesem Test in den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} positiver als in der 10^{-1} Verdünnung. Dieser Effekt ist als Prozonen-Phänomen bekannt.

Im ELISA für WHsAg waren vier Woodchuckseren in einer Verdünnung von 10^{-3} deutlich positiv, eines in einer Verdünnung von 10^{-1} , dieses war das Serum das im AUSRIA^R nicht als positiv erkannt wurde. Von den Humansenen reagierte im WHsAg-ELISA nur eines deutlich positiv bis zu einer Verdünnung von 10^{-1} , ein weiteres war unverdünnt als schwach positiv zu erkennen. Die anderen Humansenen waren in diesem Testsystem nicht als positiv erkennbar. Der cut off-Wert lag bei einer OD₄₈₆ von 0,5.

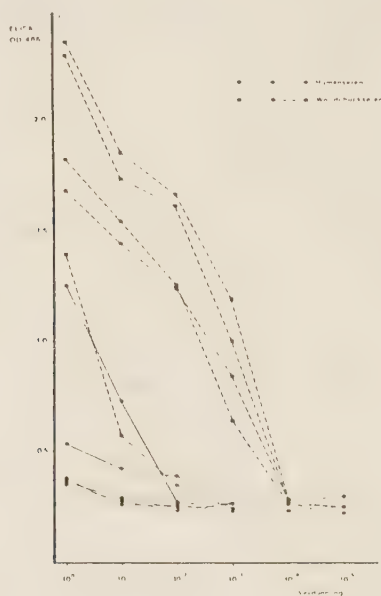


Abb. 19: Titration WHsAg positiver Woodchuckseren und HBsAg positiver Humansenen im WHsAg-ELISA

5.6. Optimierung des Tests für anti-WHs

5.6.1. Antigentitration

Zur Antigentitration wurde eine Mikrotiterplatte mit einer 1:400 Verdünnung anti-WHs IgG beschichtet und das Antigen in einer log 2 Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:4096 in Doppelansätzen titriert. Die relative Menge gebundenen Antigens wurde mit einer 1:100 Verdünnung von peroxidasegekoppeltem anti-WHc bestimmt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 15 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,22.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:64 gewählt.

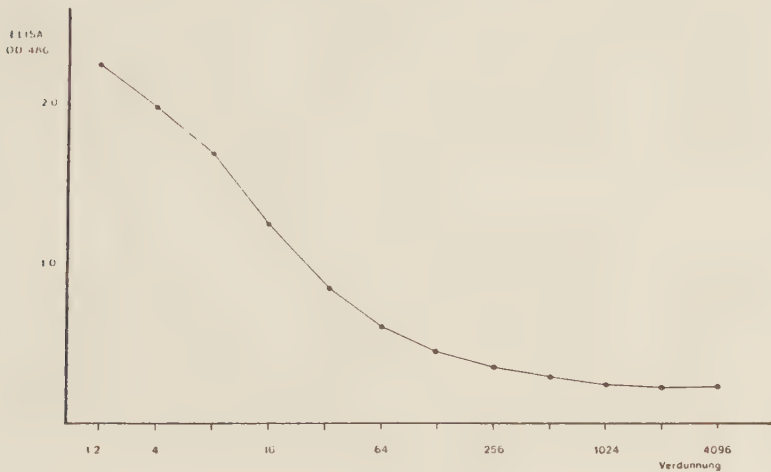


Abb. 20: Optimierung des Tests für anti-WHs: Antigentitration

5.6.2. Titration von anti-WHs zur Beschichtung der Testplatten

Eine Testplatte wurde mit einer 1:2 Verdünnungsreihe von 1:25 bis 1:51200 anti-WHs IgG im Doppelansatz beschichtet, und mit der zuvor bestimmten Antigenverdünnung von 1:64 inkubiert. Die relative Menge gebundenen Antigens wurde mit einer 1:100 Verdünnung peroxidasemarkierter anti-WHs IgG ermittelt. Die Reaktion wurde nach 20 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,2.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:800 gewählt.

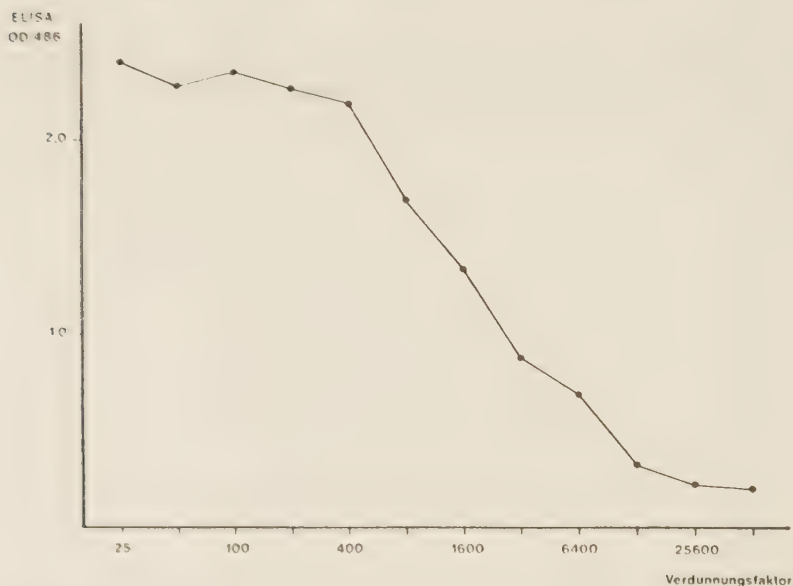


Abb. 21: Optimierung des Tests für anti-WHs; Titration von anti-WHs IgG zur Beschichtung der Testplatten.

5.6.3. Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHs

Auf eine mit den zuvor ausgetesteten Verdünnungen von anti-WHs (1:800) und WHsAg (1:64) vorbeschichtete Testplatte wurde als Doppelansatz eine 1:2-Verdünnungsreihe von 1:6,25 bis 1:12800 peroxidasegekoppelter anti-WHs IgG gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5 min gestoppt.

Für die graphische Darstellung wurde jeweils der Mittelwert eines Doppelansatzes gebildet. Die OD₄₈₆ eines Ansatzes mit PBS lag bei 0,025.

Für den Test wurde eine Verdünnung von 1:100 gewählt.

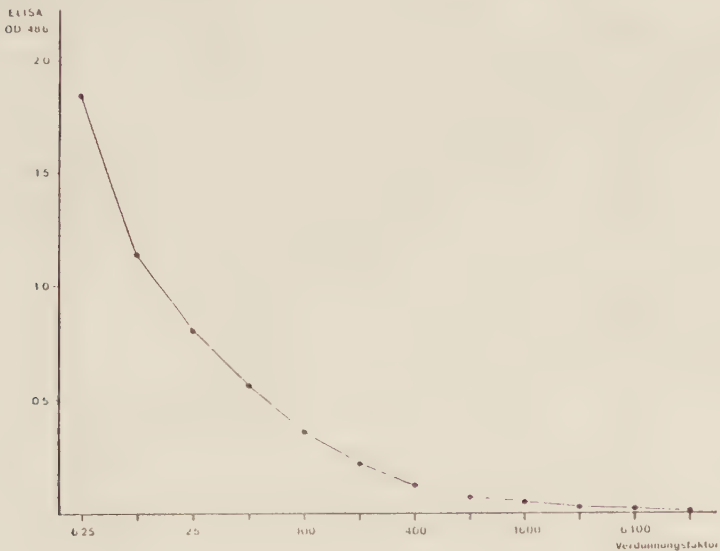


Abb. 22: Optimierung des Tests für anti-WHs: Titration von peroxidasemarkiertem anti-WHs

5.6.4. Titration anti-WHs positiver und anti-WHs negativer Seren

Zur Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität des ELISA wurden drei als für anti-WHs positive und drei als für anti-WHs negativ bekannte Woodchuckseren in einer log 5 Verdünnungsreihe titriert.

Die drei positiven Seren waren dabei deutlich reaktiv bis zu einer Verdünnung von $1:5^4$ ($1:625$). Die negativen Seren zeigten in allen Verdünnungsstufen keine Reaktion.

Als positiv wurde ein Inhibitionswert $\geq 50\%$ bewertet.

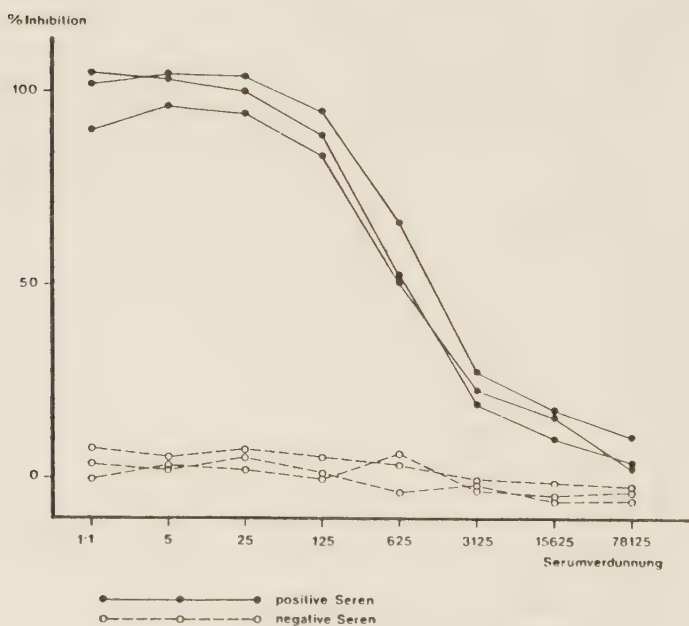


Abb. 23: Titration anti-WHs positiver und negativer Woodchuckseren

Der ELISA wurde verglichen mit einem kommerziell erhältlichen Test für anti-HBs (AUSAB^R, Abbott). Es wurden fünf anti-WHs positive Woodchuckseren und fünf anti-HBs positive Humanseren in einer log 5 Verdünnungsreihe getestet.

Von den Woodchuckseren reagierte lediglich eines schwach positiv im AUSAB^R, die anderen Woodchuckseren waren negativ. Das schwach reaktive Serum wurde im ELISA als am stärksten positiv gefunden.

Die Humanseren waren im ELISA alle negativ. Lediglich eines zeigte eine geringe Reaktion, die aber deutlich in dem Bereich lag, der als negativ angesehen wurde. Dieses Serum war im AUSAB^R am stärksten positiv.

Von sieben anti-HBs positiven Seren aus einer Impfstudie mit Titern von 10^{-3} und 10^{-4} reagierte im anti-WHs ELISA keines.

		anti-WHs ELISA	anti-HBs AUSAB ^R
Woodchuckserum	1	1:25	negativ
	2	1:625	negativ
	3	1:625	1:1
	4	1:125	negativ
	5	1:25	negativ
Humanserum	1	negativ	1:125
	2	negativ	1:625
	3	negativ	1:25
	4	negativ	1:25
	5	negativ	1:125

Tab. 2: Vergleich des ELISA für anti-WHs mit einem Test für anti-HBs (AUSAB^R)

5.7. Experimentelle Infektion

Von den vier experimentell infizierten Tieren entwickelten zwei (W 8 und W 9) eine Infektion.

Woodchuck 8 entwickelte vom 14. Tag p. i. an eine Virämie, die bis zum 33. Tag nachweisbar war. WHV-DNA war nur in einem Serum (Tag 21) nachweisbar, dieses Serum wies auch den höchsten Antigengehalt auf. Vom 29. Tag an trat anti-WHs auf, das Auftreten der Antikörper korrelierte mit der Beendigung der Virämie. Der anti-WHs-Titer stieg über einen Zeitraum von etwa vier Wochen an und blieb dann in etwa konstanter Höhe erhalten.

Anti-WHc konnte vom 29. Tag p. i. in zunehmender Menge nachgewiesen werden.

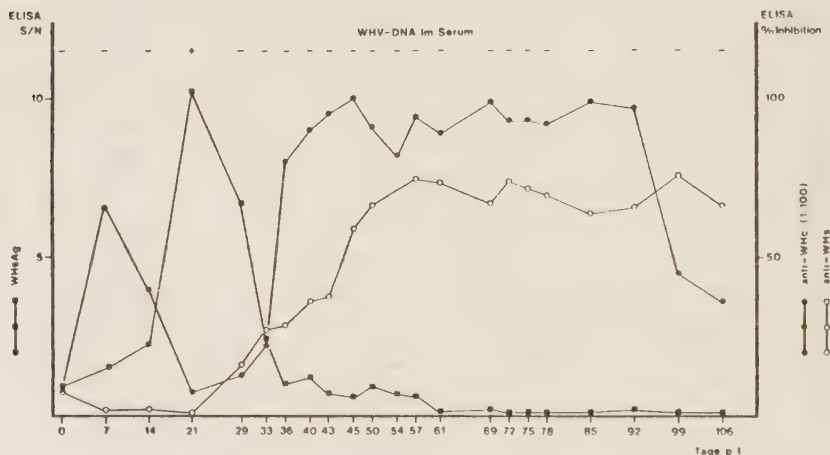


Abb. 24: Serummarker nach experimenteller Infektion bei Woodchuck Nr. 8.

Anti-WHc wurde im 1:100 verdünnten Serum gemessen, WHsAg und anti-WHs im unverdünnten Serum.

Als positiv für WHsAg wurden Seren bewertet, deren S/N Verhältnis $>2,1$ war. Als positiv für anti-WHc oder anti-WHs wurden Seren bewertet, deren Inhibition mehr als 50% betrug.

Der anti-WHc-Peak an den Tagen 7 und 14 war auf das Inokulum zurückzuführen.

Bei Woodchuck 9 wurde gleichfalls ab dem 14. Tag p. i. WHsAg im Serum nachweisbar. WHV-DNA war am 21. und 25. Tag nachweisbar. Antikörper gegen das WHV-Oberflächenprotein waren bis zum Zeitpunkt des Todes (Tag 25) bei diesem Tier nicht nachweisbar. In der Leber dieses Tieres waren am Tag 25 replikative Formen von WHV-DNA zu finden, wobei es sich um relativ große Mengen kovalent geschlossener zirkulärer DNA handelte.

Bei einem Kontrolltier (Woodchuck Nr. 7) waren während des Beobachtungszeitraums von 105 Tagen keine WHV-Marker nachweisbar.

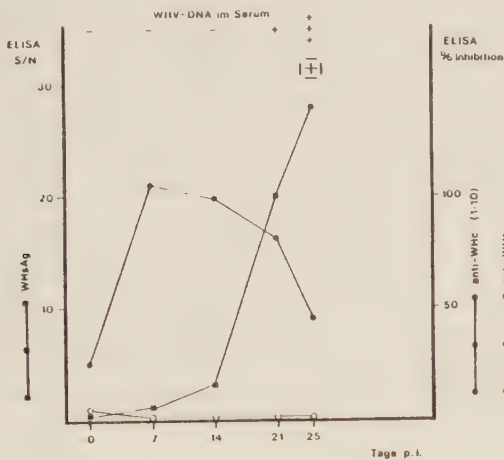


Abb. 25: Serummarker nach experimenteller Infektion bei Woodchuck Nr. 9.

Anti-WHc wurde im 1:10 verdünnten Serum gemessen, WHsAg und anti-WHs im unverdünnten Serum.

Als positiv für WHsAg wurden Seren bewertet, deren S/N Verhältnis $>2,1$ war. Als positiv für anti-WHc oder anti-WHs wurden Seren bewertet, deren Inhibition mehr als 50% betrug.

Die beiden anderen Tiere (W 472 und W 476) hatten zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion bereits Antikörper gegen das WHsAg und gegen das WHcAg. Diese Antikörper waren aber zum Zeitpunkt der Infektion nicht nachweisbar, weil keine sensitiven Testsysteme zur Verfügung standen. Bei diesen beiden Tieren war ein deutlicher Anstieg des anti-WHc-Titers innerhalb von fünfzehn Tagen nach der Inokulation feststellbar, dieser Titeranstieg war unabhängig von den mit dem Inokulum zugeführten Antikörpern. Woodchuck Nr. 472 hatte am Tag der Infektion eindeutig nachweisbare Antikörper gegen WHcAg im unverdünnten Serum, Woodchuck Nr. 476 war eindeutig positiv bei einer Serumverdünnung von 1:10.

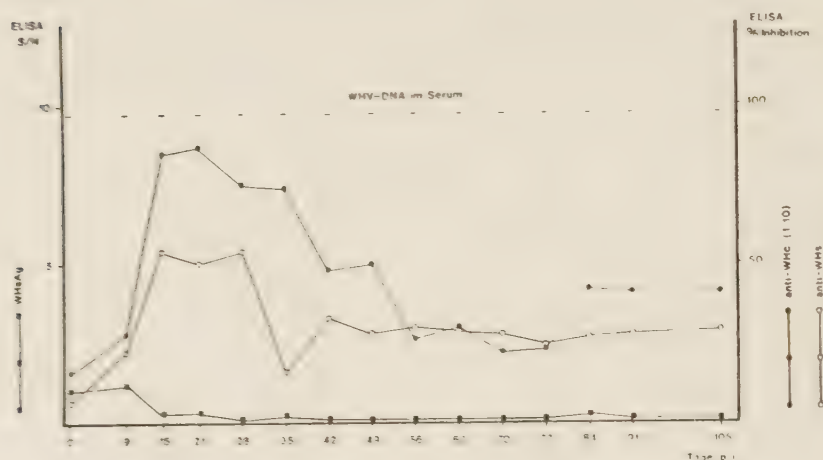


Abb. 26: Serummarker nach experimenteller Infektion bei Woodchuck Nr. 472.

Anti-WHc wurde im 1:10 verdünnten Serum gemessen, WHsAg und anti-WHs im unverdünnten Serum.

Als positiv für WHsAg wurden Seren bewertet, deren S/N Verhältnis $>2,1$ war. Als positiv für anti-WHc oder anti-WHs wurden Seren bewertet, deren Inhibition mehr als 50% betrug.

Beide Tiere zeigten außerdem einen der anti-WHs-Titeranstieg innerhalb von neun Tagen, der bis zum 15. Tag noch deutlicher wurde. Bei W 472 war im Nullserum kein anti-WHs nachweisbar, der Antikörperspiegel stieg auch nur für drei Wochen deutlich an, um dann wieder abzufallen. Bei Woodchuck 476 war zum Inokulationszeitpunkt anti-WHs nachweisbar. Der Anstieg des Antikörperspiegels war weniger signifikant als bei W 472, ein Abfall trat etwa zur gleichen Zeit auf, war aber etwas weniger deutlich.

Weder bei W 472 noch bei W 476 konnte WHsAg oder WHV-DNA im Serum nachgewiesen werden.

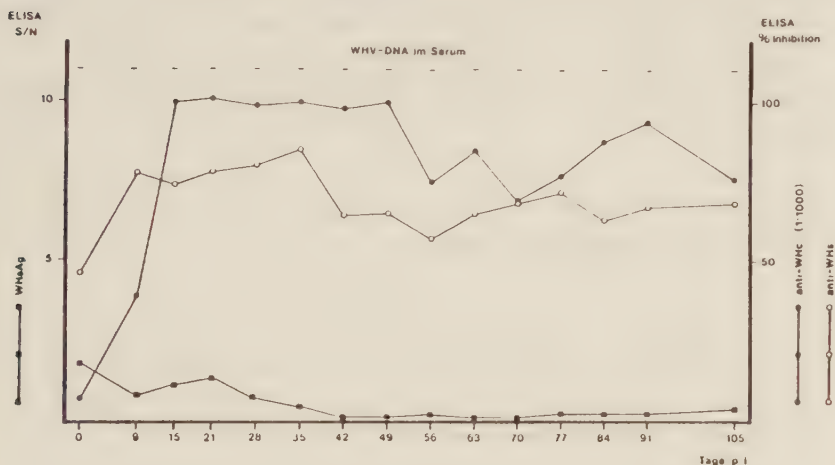


Abb. 27: Serummarker nach experimenteller Infektion bei Woodchuck Nr. 476.

Anti-WHc wurde im 1:1000 verdünnten Serum gemessen, WHsAg und anti-WHs im unverdünnten Serum.

Als positiv für WHsAg wurden Seren bewertet, deren S/N Verhältnis $>2,1$ war. Als positiv für anti-WHc oder anti-WHs wurden Seren bewertet, deren Inhibition mehr als 50% betrug.

5.8. Nachweis von WHV-DNA

5.8.1. WHV-DNA-Nachweis im Serum

Bei Woodchuck Nr. 8 war nur in einem Serum, am Tag 21 p. i., WHV-DNA in einer Menge von $\leq 2,8$ pg/ μ l nachzuweisen. In den Seren von Woodchuck Nr. 9 war am Tag 21 p. i. WHV-DNA in einer Menge von $\leq 5,6$ pg/ μ l nachweisbar, am Tag 25 p. i. in einer Menge von ≤ 90 pg/ μ l.

In keinem der Seren von Woodchuck 472 und 476 war WHV-DNA nachweisbar.

5.8.2. WHV-DNA-Nachweis in der Leber

In der Leberprobe von Woodchuck 9 vom 25. Tag p. i. wurde WHV-DNA gefunden. Hier zeigten sich in der Gelelektrophorese Banden, die aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit einer Länge der gefundenen DNA-Stränge von 4000 und 2200 Basenpaaren entsprach.

Die Bande mit 4000 bp stammte von einer doppelsträngigen zirkulären WHV-DNA. Bei der Bande, die mit einer Geschwindigkeit von 2200 bp wanderte, handelte es sich um kovalent geschlossene zirkuläre WHV-DNA (cccDNA), die aufgrund ihrer Konfiguration bei der Elektrophorese schneller wandert. Die tatsächliche Länge der DNA-Stränge kann nur bestimmt werden, wenn sie in linearer Form vorliegen. In beiden Fällen handelte es sich, wie nach der Linearisierung durch den Verdau mit Eco R I deutlich wird, um Stränge mit einer Länge von 3300 bp (Abb. 28), was der Größe des WHV-Genoms entspricht.

In allen anderen Leberproben, sowohl von W 9 als auch von den anderen Tieren, war keine WHV-DNA nachweisbar.

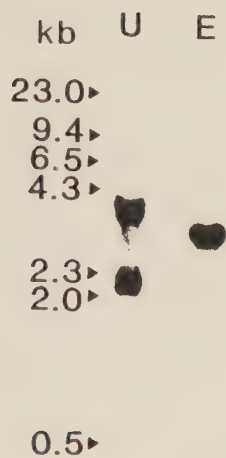


Abb. 28: Gelelektrophorese: WHV-DNA in der Leber von Woodchuck Nr. 9
 U: WHV-DNA unverdaut
 E: WHV-DNA mit *Eco R I* verdaut

6. Diskussion

Die Infektion von Woodchucks mit dem Woodchuck Hepatitis Virus dient, aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zum HBV und seiner Biologie, als geeignetes Modell für die Hepatitis B des Menschen. Beim Menschen und beim Woodchuck gibt es einen chronischen Verlauf der Infektion, der zur Entstehung eines hepatozellulären Carcinoms führen kann.

Die in dieser Arbeit entwickelten spezifischen und sensitiven Testsysteme und die experimentellen Infektionen sollten zum einem dazu dienen, weitere Aufschlüsse über die Virusvermehrung zu gewinnen, zum anderen dazu, in weiteren Forschungsvorhaben im Besitz adäquater Testverfahren zu sein. Dies gilt vor allem im Hinblick auf die Untersuchung von chronischen Infektionen, Versuchen zur Hemmung der viralen Replikation durch antivirale Substanzen, und Studien zur virusinduzierten Carcinogenese.

6.1. Beurteilung der ELISA's für die WHV-Marker

Der Vergleich der Sensitivität der Tests für die serologischen WHV-Marker mit den entsprechenden Tests für die HVB-Marker zeigt, daß die Entwicklung spezifischer und sensitiver Testsysteme notwendig war, um den Infektionsverlauf im Woodchuck zu verfolgen.

Die Spezifität des Tests für anti-WHc ergibt sich aus dem Vergleich bekannt positiver und bekannt negativer Seren (z. B. Präseren und Rekonvaleszenten-seren). Zum anderen wurde bei der Isolierung aus Hepatozyten das Core-Protein bei der Reinigung über einen CsCl-Gradienten bei der erwarteten Dichte gefunden, bei einer Kontrollpräparation war kein Antigen auffindbar. Der Antigenpeak im CsCl-Gradienten umfaßte einen weiten Dichtebereich, dies ist möglicherweise auf eine Überladung des Gradienten zurückzuführen. Im weiteren Verlauf der Testentwicklung ergaben sich aber daraus keine nachteiligen Auswirkungen.

Des weiteren zeigte sich bei der Prüfung der Kreuzreaktion mit einem kommerziellen anti-HBc-Test, daß sowohl Woodchuckseren im anti-HBc-Test als positiv erkannt wurden, als auch in Humanseren mit dem anti-WHc-ELISA Antikörper nachweisbar waren.

Die Stärke der Kreuzreaktion für anti-WHc mit anti-HBc in den gegebenen Testsystemen (anti-WHc ELISA, CORAB^R) muß nach den vorliegenden Ergebnissen als 0,1% angesehen werden. Dies stimmt etwa mit den Angaben von Ponzetto (41) überein, der die Sensitivität eines anti-WHc spezifischen RIA um den Faktor 1000 höher angibt.

In von anderen Autoren (32,59,71,72) durchgeführte Untersuchungen, mittels Elektronenmikroskopie, Immundiffusion oder passiver Hämagglutination, über die Kreuzreaktion, wurde diese als wesentlich größer angegeben.

Im Vergleich der Empfindlichkeit scheint der ELISA, etwa vergleichbar mit dem RIA, sowohl in der Sensitivität als auch in der Spezifität der passiven Hämagglutination deutlich überlegen zu sein, wobei dem ELISA der Vorteil der einfacheren Handhabung zukommt.

Die Spezifität des ELISA für anti-WHs ist durch mehrere Ergebnisse gesichert.

Zum einen wurde in den Reinigungsschritten bei der Präparation des Antigens die Kreuzreaktion zwischen WHV und HBV ausgenutzt. Daher war weitgehend sichergestellt, daß es sich bei den in den Analysenschritten gefundenen und dann weiterverwendeten Präparationen um WHsAg gehandelt hat.

Zum anderen wurde das WHsAg im CsCl-Gradienten bei einer Dichte, die für das WHsAg beschrieben wurde, gefunden, wobei der Antigennachweis wieder über die Kreuzreaktion mit dem HBsAg geführt wurde. Darüber hinaus konnte in den Peakfraktionen des WHsAg WHV-DNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

Außerdem ergibt sich die Spezifität des ELISA aus dem Vergleich anti-WHs positiver- und negativer Seren.

Darüber hinaus läßt sich die Spezifität daraus ableiten, daß anti-WHs positive Seren mit hohen Titern im Test für anti-HBs reagierten.

Die Sensitivität des anti-WHs-ELISA wird aus dem Vergleich mit dem anti-HBs-Test deutlich. Die Stärke der Kreuzreaktion liegt dabei in einer Größenordnung von etwa 0,1%. Keines der Humanseren reagierte im anti-WHs ELISA, auch nicht hochtitrige Seren aus einer Impfstudie. Nur ein hochtitriges anti-WHs Serum, das bis zu einer Verdünnung von 1:625 positiv beurteilt

wurde, aber in einer 1:3625 Verdünnung noch reaktiv war, reagierte im anti-HBs-Test. Daß die Seren aus der Impfstudie nicht kreuzreagierten, liegt möglicherweise daran, daß nach einer Impfung nur wenige Epitope als Antigen determinanten erkannt werden, die aber beim WHV vielleicht nicht vorhanden sind.

Für die Spezifität des WHsAg-ELISA gelten die Ergebnisse wie für den anti-WHs-ELISA.

Die Stärke der Kreuzreaktion zwischen WHsAg und HBsAg ist schwierig zu beurteilen. Sowohl Woodchuckseren als auch Humanserren können im heterologen Test positiv gefunden werden, wenn sie in ausreichender Menge s-Antigen enthalten, allerdings ist die Reaktion im heterologen Test signifikant geringer. Aufgrund der Ergebnisse, daß die stark WHsAg-positiven Woodchuckseren im WHsAg-ELISA noch in einer Verdünnung von 1:1000 reagierten, im HBsAg-Test aber in dieser Verdünnung negativ waren, und zudem in niedrigen Verdünnungen nur schwach reagierten, kann die Kreuzreaktion mit 0,1% angenommen werden. Gleiches gilt weitgehend für die Humanserren, die alle im HBsAg-Test mindestens bis zu einer Verdünnung von 1:1000 positiv waren. Drei von diesen Seren zeigten keine Kreuzreaktion, eines war im WHsAg-ELISA nur schwach positiv und eines, das im HBsAg-Test am stärksten reaktiv war, war bis 1:10 positiv.

6.2. Experimentelle Infektion

Woodchuck 8 entwickelte eine Infektion, bei der WHsAg nach 14 Tagen ein geringer, nach 21 Tagen der höchste Antigengehalt im Serum nachweisbar war. Am Tag 29 fiel der WHsAg-Gehalt im Serum bereits wieder ab, am 36. Tag war kein Antigen mehr nachweisbar. Insgesamt zeigten die Seren im Infektionsverlauf nur eine geringe Antigenkonzentration und nur geringe Mengen von WHV-DNA. Die kurze Inkubationszeit ist wahrscheinlich auf die große Infektionsdosis zurückzuführen.

Weil die akute Phase der Infektion erst nach vier bis sechs Wochen erwartet wurde, fehlen frühere Proben, die in die erwartete Inkubationszeit gefallen wären.

In einer Biopsieprobe vom 36. Tag p. i. (=1. Biopsieprobe im Infektionsverlauf) war bereits keine WHV-DNA mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war, wie sich anhand des Verlaufs der serologischen Marker zeigen läßt, die akute Phase der Infektion bereits beendet.

Der 1. anti-WHc-Peak, der an den Tagen 7 und 14 nachweisbar war, war auf das Inokulum zurückzuführen, vom Tag 33 p. i. an war ein Anstieg von anti-WHc feststellbar.

Woodchuck 9 entwickelte ebenfalls eine akute Infektion. Die Inkubationszeit dauerte hier gleichfalls nur 14 Tage, die WHsAg-Konzentration im Serum stieg aber über den 21. Tag p. i. hinaus an, wobei er am 21. Tag deutlich höher war als bei W 8. Am Tag 25 starb das Tier während eines therapeutisch-operativen Eingriffs.

Anti-WHc und anti-WHs wurden nicht nachweisbar. Das Auftreten von anti-WHc war wie bei W 8 auf das große Inokulum zurückzuführen. Das hier im Vergleich zu W 8 scheinbar längere Persistieren des vom Inokulum herrührenden anti-WHc-Titers (Abb. 25) liegt lediglich in der graphischen Darstellung begründet.

Aufgrund der kurzen Inkubationszeit bei beiden Tieren und der Kürze der virämischen Phase bei Woodchuck Nr. 8, sowie den Hinweisen aus der Literatur (25,34,71) muß man davon ausgehen, daß sowohl die Dauer der Inkubationszeit, als auch möglicherweise die Dauer der virämischen Phase mit steigender Infektionsdosis abnimmt.

Von Woodchuck Nr. 9 wurde post mortem die Leber entnommen und auf replikative Formen von WHV-DNA untersucht. Dabei zeigte sich, daß wenig replikative Formen nachweisbar waren, aber viel kovalent geschlossene zirkuläre WHV-DNA (cccDNA). Daraus könnte man ableiten, daß zu Beginn der Infektion, wie beim DHBV (69), zunächst in einem internen Zyklus ein großer Pool cccDNA gebildet wird. Im Zellkern werden von der cccDNA die RNA-Transkripte abgeschrieben von denen im Zytoplasma über reverse Transkription die DNA gebildet wird, die aber möglicherweise zum überwiegenden Teil wieder direkt in den Kern eingeschleust und zu cccDNA komplettiert wird. Möglicherweise werden erst später die Hüllproteine synthetisiert, die die Corepartikel umgeben und dann ausgeschleust werden.

Die cccDNA ist in der Lage in das Wirtszellgenom zu integrieren. Integrierte DNA wird auch bei chronisch infizierten Woodchucks mit hepato-

zellulären Carcinomen in etwa 80% der Fälle (51) gefunden. Es ist aber bisher keine spezifische Integrationsstelle nachgewiesen worden. Inwieweit eine Integration für eine Tumorentstehung verantwortlich ist, ist derzeit noch unklar. Möglicherweise ist eine Deletion des c-Gens für die Tumorentstehung mitverantwortlich. Da das c-Protein für die immunologisch zytotoxische Reaktion auf die infizierte Leberzelle verantwortlich ist, könnte aufgrund der Abwesenheit eines intakten c-Proteins diese Reaktion ausbleiben, und so zu einem Selektionsvorteil gegenüber anderen infizierten Zellen werden. Die Zelltransformation muß aber über einen anderen Mechanismus erfolgen.

Zwei Woodchucks (W 472 und W 476) entwickelten keine Infektion. Diese beiden Tiere hatten bereits zum Inokulationszeitpunkt Antikörper, die mit den bis dahin zur Verfügung stehenden Testmethoden nicht nachweisbar waren. Woodchuck 472 hatte bereits anti-WHc das im unverdünnten Serum nachweisbar war, bei W 476 waren anti-WHc mit einem Titer von 1:10, und anti-WHs im unverdünnten Serum vorhanden. Nach den in den Abb. 26 und 27 dargestellten Titern für anti-WHc sind am Tag 0 scheinbar keine Antikörper vorhanden. Der anti-WHc-Titer ist jedoch bei W 472 (Abb. 26) in einer 1:10 Verdünnung dargestellt, bei W 476 (Abb. 27) in einer 1:1000 Verdünnung.

Bei beiden Tieren trat außerdem ein schneller Antikörperanstieg auf, der als Booster-Effekt des Inokulums interpretiert werden kann.

Daß dabei nicht nur ein Anstieg des anti-WHs-Titers, sondern auch des anti-WHc-Titers feststellbar war, läßt vermuten daß anti-WHc nicht nur aufgrund einer Virusreplikation gebildet wird, wie dies Wong (76) und Ponzetto (40) interpretieren, sondern bereits die Auseinandersetzung mit dem vollständigen Viruspartikel zu einer Bildung von anti-WHc führt.

Mit dem vorhandenen Modell der experimentellen Infektion von Woodchucks mit dem WHV können nun verschiedene chemische Verbindungen auf ihre Replikationshemmung untersucht, und die Möglichkeit ihres therapeutischen Einsatzes geprüft werden. Dies soll das Ziel weiterer Studien sein.

7. Zusammenfassung

Die Infektion von amerikanischen Waldmurmeltieren (*Woodchuck*, *Marmota monax*) mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) dient als Modell für die akute und chronische Hepatitis B Virus (HBV) Infektion des Menschen und für Untersuchungen zur Ätiologie des primären Leberzellcarcinoms.

Der Verlauf der WHV-Replikation und die Entwicklung der humoralen Immunantwort nach experimenteller Infektion mit dem WHV in Woodchucks wurden in dieser Arbeit untersucht.

Vier Woodchucks wurden experimentell mit WHV infiziert, und der Infektionsverlauf anhand der Seromarker WHsAg, anti-WHs, anti-WHc und WHV-DNA untersucht. Für die Untersuchung der WHV-Replikation wurden DNA-Hybridisierungsmethoden verwendet. Zur Untersuchung der Immunantwort wurden Enzymimmunoassays (ELISA) für anti-WHc, WHsAg, und anti-WHs entwickelt.

Mit dem anti-WHc ELISA konnten in Seren von chronisch WHV-infizierten Woodchucks Antikörper bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} nachgewiesen werden. Mit den Tests für WHsAg und anti-WHs konnten diese Marker noch in Verdünnungen $\geq 10^{-3}$ gefunden werden.

Ein Vergleich dieser spezifischen ELISA's mit den entsprechenden Tests für die HBV Marker zeigte, daß die serologische Kreuzreaktion beider Viren bei etwa 0,1% liegt.

Zwei Woodchucks zeigten nach experimenteller Infektion eine WHV-Replikation. WHsAg wurde 14 Tage p.i. nachweisbar. Bei einem Tier wurde eine nur kurze Virämie beobachtet, während der WHV-DNA in geringer Menge im Serum nachgewiesen werden konnte. Vom 33. Tag p.i. an wurden anti-WHs und anti-WHc nachweisbar. Bei einem zweiten Tier wurde WHV-DNA am 21. und 25. Tag p.i. im Serum nachgewiesen. In der Leber dieses Tieres konnte am Tag 25 p.i. WHV-DNA nachgewiesen werden, wobei es sich überwiegend um kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA) handelte.

Bei zwei weiteren Tieren lagen zum Infektionszeitpunkt niedrige Antikörpertiter vor, die eine Infektion verhinderten.

7.1. Summary

WHV-Replication and Serummarkers after Experimentally Infection of Woodchucks with Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)

The infection of woodchucks (*Marmota monax*) with woodchuck hepatitis virus (WHV) is a useful model for the hepatitis B virus (HBV) infection of humans, and for studies on the etiology of primary liver cell carcinoma.

The course of WHV-replication and the evolution of humoral immuneresponse after experimental infection was examined in this study.

Four woodchucks were experimentally infected with WHV. The outcome of the infection was studied using the serological markers: WHsAg, anti-WHs, anti-WHc and the WHV-DNA. WHV-DNA was detected by DNA-spothybridisation. For the detection of WHsAg, anti-WHs and anti-WHc specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), were developed.

With the ELISA for anti-WHc we could detect antibodies in sera of chronically infected woodchucks up to a dilution of 10^{-5} . With the ELISA's for WHsAg and anti-WHs these markers could be detected in dilutions $\geq 10^{-3}$.

A comparison of these specific ELISA with the corresponding tests for HBV-markers showed that the serological cross reaction of both viruses is about 0.1%.

Two woodchucks developed a WHV-viremia after experimental infection. WHsAg was found 14 days p.i.. One woodchuck had a short viremia with low level of WHV-DNA in serum. Thirtythree days p. i. anti-WHs and anti-WHc was found. In the other animal WHsAg was also detected from day 14 p. i., with WHV-DNA on day 21 and 25 p. i. in the serum. WHV-DNA was found in the liver of this animal at day 25 p. i.. This DNA was mainly covalent closed circular WHV-DNA (cccWHV-DNA).

Two woodchucks who had low level of antibodies at the time of inoculation, they were protected against the infection.

8. Literaturverzeichnis

1. Berninger, M.; M. Hammer; B. H. Hoyer; J. L. Gerin
1982
An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum
J. Med. Virol. 9: 57-68
2. Blum, H. E.; A. T. Haase; J. D. Harris; D. Walker; G.N. Vyas
1984
Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: Demonstration of cytoplasmic minus strand DNA by blot analysis and in situ hybridisation
Virology 139: 87-96
3. Cote, P. J. Jr.; G. M. Dapolito; J. W.-K. Shih; J. L. Gerin
1982
Surface antigenic determinants of mammalian "hepadna-viruses" defined by group- and class-specific monoclonal antibodies
J. Virol. 42: 135-142
4. Cote, P. J. Jr.; J. L. Gerin
1983
Nonoverlapping antigenic sites of woodchuck hepatitis virus surface antigen and their cross-reactivity with ground squirrel hepatitis virus and hepatitis B surface antigens
J. Virol. 47: 15-23
5. Cote, P. J.; R. E. Engle; C. A. Langer; A. Ponzetto; J. L. Gerin
1984
Antigenetic analysis of woodchuck hepatitis virus surface antigen with site-specific radioimmunoassays
J. Virol. 49: 701-708
6. Cummings, I. W.; J. K. Browne; W. A. Salser; G. V. Tyler; R. L. Snyder; J. M. Smolec; J. Summers
1980
Isolation, characterization, and comparison of recombinant DNAs derived from genomes of human hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1842-1846

7. Enders, G. H.; D. Ganem; H. Varmus
1985
Mapping the major transcript of ground squirrel hepatitis virus: The presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant
Cell 42: 297-308

8. Feitelson, M. A.; P. L. Marion; W. S. Robinson
1981
Antigenic and structural relationship of the surface antigens of hepatitis B virus, ground squirrel hepatitis virus, and woodchuck hepatitis virus
J. Virol. 39: 447-454

9. Feitelson, M. A.; P. L. Marion; W. S. Robinson
1983
The nature of polypeptides larger in size than the major surface antigen components of hepatitis B and like viruses in ground squirrels, woodchucks and ducks
Virology 130: 76-90

10. Fields, H. A.; F. B. Hollinger; J. Desmyter; J. L. Melnick; G. R. Dreesman
1977
Biochemical and Biophysical Properties of Hepatitis B Core Particles derived from Dane Particles and infected Hepatocytes
Intervirology 8: 336-350

11. Fowler, M. J. F.; J. Monjardino; K. N. Tsiquaye; A. J. Zuckerman; H. C. Thomas
1984
The mechanism of replication of hepatitis B virus: Evidence of asymmetric replication of the two DNA strands
J. med. Virol. 13: 83-91

12. Frommel, D.; D. Crevat; L. Vitvitsky; C. Pichoud; O. Hautz; M. Chevalier; J.-A. Grimoud; J. Lindberg; C. G. Treppe
1984
Immunologic Aspects of woodchuck hepatitis
Am. J. Pathol. 115: 125-134

13. Galibert, F.; T. N. Chen; E. Mandart
1982
Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence
J. Virol. 41: 51-65

14. Gerin, J. L.; R. M. Faust; P. V. Holland
1975
Biophysical characterization of the adr subtype of hepatitis B antigen
and preparation of anti-r sera in rabbits
J. Immunol. 115: 100-105
15. Gerlich, W. H.; M. A. Feitelson; P. L. Marion; W. S. Robinson
1980
Structural relationship between the surface antigens of ground
squirrel hepatitis virus and human hepatitis B virus
J. Virol. 36: 787-795
16. Gerlich, H. W.; W. S. Robinson
1980
Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its
complete DNA strand
Cell 21: 801-809
17. Hautz, O.; C. Pichoud; L. Vitvitski; C. Treppe
1983
Use of the cross-reactivity with hepatitis B virus antigens and
antibodies for the demonstration of a woodchuck hepatitis virus 'e'
antigen-antibody-system
J. Med. Virol. 7: 45-55
18. Heermann, K. H.; U. Goldmann; W. Schwartz; T. Seyffarth;
H. Baumgarten; W. H. Gerlich
1984
Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s-
sequence
J. Virol. 52: 396-402
19. Howard, C. R.
1986
The biology of hepadnaviruses
J. gen. Virol. 67: 1215-1235
20. Hruska, J. F.; W. S. Robinson
1977
The Proteins of Hepatitis B Dane Partikel Cores
J. Med. Virol. 1: 119-131
21. Iwarson, S.; E. Tabor; H. C. Thomas; P. Snoy; R. J. Gerety
1985
Protection against hepatitis B virus infection by immunization with
hepatitis B core antigen
Gastroenterol. 88: 763-767

22. Korba, B. E.; F. Wells; B. C. Tennant; G. H. Yoakum; R. H. Purcell;
J. L. Gerin
1986
Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: the
woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis
J. Virol. 58: 1-8
23. Korba, B. E.; F. Well; B. C. Tennant; P. J. Cote; J. L. Gerin
1987
Lymphoid cells in the spleen of Woodchuck Hepatitis Virus-infected
woodchucks are a site of active viral replication
J. Virol. 61: 1318-1324
24. Landers, T. A.; H. B. Greenberg; W. S. Robinson
1977
Structure of the hepatitis B Dane particle DNA and nature of the
endogenous DNA polymerase reaction
J. Virol. 23: 368-376
25. Lindberg, J.; C. Pichoud; O. Hautz; L. Vitvitski; J. A. Grimaud;
J. M. Gilbert; L. Joubert; D. Frommel; C. Treppe
1985
Woodchuck hepatitis virus infection: serologic and histopathologic
course and outcome
Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 59-61
26. Mandart, E.; A. Kay; F. Galibert
1984
Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genom:
comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences
J. Virol. 49: 782-792
27. Marion, P.; L. S. Oshiro; D. C. Reger
1980
A virus of beechy ground squirrels that is related to hepatitis B virus
of humans
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2941-2945
28. Mason, W. S.; G. Seal; J. Summers
1980
Virus of peking ducks with structural and biological relatedness to
human hepatitis B virus
J. Virol. 36: 829-836

29. Mayr, A.; P. A. Bachmann; B. Bibrack; G. Wittmann
Virologische Arbeitsmethoden
Gustav Fischer Verlag
Stuttgart 1974
30. Miller, R. H., C. T. Tran; W. S. Robinson
1984
Hepatitis B virus particles of plasma and liver contain viral DNA-RNA
hybrid molecules
Virology 139: 53-63
31. Miller, R. H.; P. L. Marion; W. S. Robinson
1984
Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from
infected liver are converted to viral DNA molecules during an
endogenous DNA polymerase reaction
Virology 139: 64-72
32. Millman, I.; T. Halbherr; H. Simmons
1982
Immunological cross-reactivities of woodchuck and hepatitis B viral
antigens
Infect. Immun. 35: 752-757
33. Millman, I.; G. A. Martini
1982
Woodchuck hepatitis Virus
In: W. Szmunes; H. J. Alter; J. E. Maynard (ed.)
Viral Hepatitis, 1981 International Symposium
The Franklin Institute Press, Philadelphia Pa.: 712
34. Millman, I.; L. Southam; T. Halbherr; H. Simmons; C. M. Kang
1984
Woodchuck Hepatitis Virus: Experimental Infection and natural
occurrence
Hepatology 4: 817-823
35. Mitamura, K.; B. H. Hoyer; A. Ponzetto; J. Nelson; R. H. Purcell;
J. L. Gerin
1982
Woodchuck hepatitis virus DNA in woodchuck liver tissues
Hepatology 2: 475-505

36. Moriarty, A. M.; H. Alexander; R. A. Lerner
1985
Antibodies against peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma
Science 227: 429-433
37. Mörröy, T.; J. Etiemble; C. Trepo; P. Tiollais; M.-A. Buendia
1985
Transcription of woodchuck hepatitis virus in the chronically infected liver
EMBO 4: 1507-1514
38. Neurath, A. R.; S. B. H. Kent; N. Strick; P. Taylor; C. E. Stevens
1985
Hepatitis B virus contains pre-s-gene-encoded domains
Nature 315: 154-156
39. Ogston, C. W.; G. J. Jouak; C. E. Rogler; S. M. Astrin; J. Summers
1982
Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks
Cell 29: 385-394
40. Ponzetto, A.; P. J. Cote; E. C. Ford; R. H. Purcell; J. L. Gerin
1984
Core antigen and antibody in woodchucks after infection with woodchuck hepatitis virus
J. Virol. 52: 70-76
41. Ponzetto, A.; P. J. Cote; E. C. Ford; R. Engle; J. Cicmanec; M. Shapiro; R. H. Purcell; J. L. Gerin
1985
Radioimmunoassay and characterization of woodchuck hepatitis virus core antigen and antibody
Virus Research 2: 301-315
42. Popper, H.; J. W.-K. Shih; J. L. Gerin; D. C. Wong; B. H. Hoyer; W. T. London; D. L. Sly; R. H. Purcell
1981
Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations
Hepatology 1: 91-98

43. Popper, H.; M.A. Gerber; S. N. Thung
1982
The relationship of hepatocellular carcinoma to hepatitis B and related viruses in man and animals
Hepatology 2: 15-95

44. Popper, H.; L. Roth; R. H. Purcell; B. C. Tennant; J. L. Gerin
1987
Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 866-870

45. Purcell, R. H.; B. C. Tennant; J. L. Gerin
1986
The woodchuck hepatitis virus: A useful model for Hepatitis B virus
Shanghai international symposium on liver cancer and hepatitis

46. Robinson, W. S.; D. A. Clayton; R. L. Greenman
1974
DNA of a human hepatitis B virus candidate
J. Virol. 14: 384-391

47. Robinson, W. S.
1980
Genetic variation among hepatitis B and related viruses
Ann. N. Y. Acad. Sci. 354: 371-378

48. Robinson, W. S.; P. Marion; M. A. Feitelson; A. Siddiqui
1982
The Hepadna virus group: hepatitis B and related viruses
In: Viral Hepatitis
Eds: Smuness, H.; J. Alter; J. E. Maynard
Philadelphia, Franklin Institute Press: 57-68

49. Roggendorf, M.; F. Deinhardt
1982
Neuere Ergebnisse zur Struktur und Pathogenese der Hepatitis B und zur Charakterisierung ihres Erregers
Triangel 21: 123-131

50. Roggendorf, M.
1985
Die Hepadnaviren und ihre Korrelation zum hepatozellulären Carzinom
Internist 26: 621-627

51. Roggendorf, M.
Persönliche Mitteilungen

52. Rogler, C. E.; J. Summers
1982
Novel forms of woodchuck hepatitis virus DNA isolated from
chronically infected liver nuclei
J. Virol. 44: 852-863
53. Romeis, B.
Mikroskopische Technik
16. Aufl.
R. Oldenburg Verlag
München, Wien 1968
54. Roth, L.; J. M. King; W. E. Hornbuckle; H. J. Harvey; B. C. Tennant
1985
Chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma associated with
persistent woodchuck hepatitis virus infection
Vet. Pathol. 22: 338-343
55. Sattler, F.; W. S. Robinson
1979
Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends
J. Virol. 32: 226-233
56. Schaeffer, E.; R. L. Snyder; J. J. Sninsky
1986
Identification and localisation of pre-s-encoded polypeptides from
Woodchuck and Ground Squirrel Hepatitis Virus
J. Virol. 57: 173-182
57. Siddiqui, A.; P. L. Marion; W. S. Robinson
1981
Groundsquirrel hepatitis virus DNA: molecular cloning and comparison
with hepatitis B virus DNA
J. Virol. 38: 393-397
58. Shih, J. W.-K.; G. M. Dapolito; J. L. Gerin
1982
Woodchuck model of type B hepatitis: radioimmunoassay for WHsAg
and anti-WHs
In: W. Szmuness; H. J. Alter; J. E. Maynard (ed.)
Viral Hepatitis, 1981 International Symposium
The Franklin Institute Press, Philadelphia Pa. : 712

59. Stannard, L. M.; O. Hautz; C. Treppe
1983
Antigenic cross-reaction between woodchuck hepatitis virus and human hepatitis B virus shown by immune electron microscopy
J. gen. Virol. **64**: 975-980
60. Snyder, R. L.
1968
Hepatomas of captive woodchucks
Am. J. Pathol. **52**: 32 (abstr.)
61. Summers, J.; J. M. Smolec; R. Snyder
1978
A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchuck
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 4533-4537
62. Summers, J.; J. M. Smolec; B. G. Werner; T. J. Kelly Jr.; R. L. Snyder
1980
Hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus are members of a novel class of DNA viruses
In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*
Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Vol. 7: 459-470
Cold Spring Harbor Laboratory
63. Summers, J.
1981
Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus
Hepatology **1**: 179-183
64. Summers, J.; W. S. Mason
1982
Properties of the Hepatitis B-Like Viruses related to their taxonomic classification
Hepatology **2**: 615-665
65. Summers, J.; W. S. Mason
1982
Replication of the genome of hepatitis B-like virus by reverse transcription of a RNA intermediate
Cell **29**: 403-415

66. Tiollais, P.; C. Pourcel; A. Dejean
1985
The hepatitis B virus
Nature 317: 489-495
67. Trepo, C.
Persönliche Mitteilungen
68. Trueba, D.; M. Phelan; J. Nelson; F. Beck; B. S. Pecha; R. J. Brown;
H. E. Varmus; D. Ganem
1985
Transmission of Ground Squirrel Hepatitis Virus to homologous and
heterologous hosts
Hepatology 5: 435-439
69. Tuttleman, J. S.; C. Pourcel; J. Summers
1986
Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in
hepadnavirus-infected cells
Cell 47: 451-460
70. Tyler, G. V.; J. Summers; R. L. Snyder
1981
Woodchuck hepatitis virus in natural woodchuck populations
J. Wildl. Dis. 17: 297-301
71. Tyler, G. V.
1984
Natural and experimental infections of woodchucks with woodchuck
hepatitis virus
Diss. University of Pennsylvania
72. Werner, B. G.; J. M. Smolec; R. L. Snyder; J. Summers
1979
Serological relationship of woodchuck hepatitis virus to human
hepatitis B virus
J. Virol. 32: 314-322
73. Will, H.; W. Reiser; T. Weimer; E. Pfaff; M. Buscher; R. Sprengel;
R. Cattaneo; H. Schaller
1987
Replication strategy of human hepatitis B virus
J. Virol. 61: 904-911

74. Wilson, M. B.; P. K. Nakane
1978
Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies
In: W. Knapp; K. Holubar; G. Wick (eds.)
Immunofluorescence and related staining techniques
Elsevier North Holland, Publishing Co., Amsterdam, pp. 215-224
75. Wong, D. C.; J. W.-K. Shih; J. L. Gerin; R. H. Purcell
1982
New assay for markers of woodchuck hepatitis infection
In: W. Szymanski, H. J. Alter, J. E. Maynard (ed.)
Viral hepatitis, 1981 International Symposium
The Franklin Institute Press, Philadelphia Pa. : 713
76. Wong, D. C.; J. W.-K. Shih; R. H. Purcell; J. L. Gerin; W. T. London
1982
Natural and experimental infection of woodchuck with woodchuck hepatitis virus, as measured by new, specific assays for woodchuck surface antigen and antibody
J. Clin. Microbiol. 15: 484-490
77. Yoffe, B.; C. A. Noonan; J. L. Melnik; F. B. Hollinger
1986
Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replicative intermediates of viral DNA
J. Infect. Diseases 153: 471-477
78. Young, R. A.; E. H. Sims
1979
The woodchuck (*Marmota monax*) as a laboratory animal
Lab. Anim. Sci. 29: 770-780
79. Young, R. A.; W. S. Webster
1985
Tumors and polycystic renal disease in two captive woodchucks (*Marmota monax*)
Lab. Anim. Sci. 35: 493-496

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Friedrich Deinhard danke ich dafür, daß ich diese Arbeit in seinem Institut durchführen konnte.

Herrn Priv. Doz. Dr. habil. Michael Roggendorf danke ich für die Überlassung des Themas, und für die Betreuung während der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Fräulein Claudia Pahlke für die hervorragende Einführung in die Laborarbeit, sowie allen Mitarbeitern des Labors, an die ich mich mit Fragen stets wenden konnte.

L e b e n s l a u f

Name	Sprotte
Vorname	Horst Lutz <u>Harald</u>
Geburtsdatum	16.10.54
Geburtsort	Dortmund
Glaubensangehörigkeit	evangelisch
Wohnort	Gotthardstr. 106 8000 München 21
Eltern	Horst Sprotte, Arbeiter Luzie Sprotte, geb. Zeidler, Hausfrau
Schulbildung	1960-1968 Volksschule in Dortmund 1968-1969 Hauptschule in Dortmund
Berufsausbildung	1969-1972 als Fernmeldehandwerker bei der Deutschen Bundespost
Berufstätigkeit	1972-1980 beim Fernmeldeamt 1 in Dortmund
Weiterbildung	1974-1976 Abendrealschule in Dortmund
Mittlere Reife	19. Mai 1976 1977-1978 Abendgymnasium in Dortmund
Abitur	12. Dezember 1978
geheiratet	05.06.1981
geschieden	31.03.1983
Studium	WS 80/81 bis WS 85/86 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
Tierärztliche Prüfung	26. November 1985
Approbation	12. März 1986
Dissertation	Jan. 1986 bis August 1987

